

MOLÉCULAS BIESPECÍFICAS DE UNIÓN A ANTÍGENO ACTIVADORAS DE CÉLULAS T

Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general a moléculas biespecíficas de unión a antígeno destinadas a la activación de las células T. Además, la presente invención se refiere a polinucleótidos codificantes de dichas moléculas biespecíficas de unión a antígeno y a vectores y células huésped que comprenden dichos polinucleótidos. La invención se refiere además a métodos para producir las moléculas biespecíficas de unión a antígeno de la invención y a métodos de utilización de dichas moléculas biespecíficas de unión a antígeno en el tratamiento de enfermedades.

Antecedentes

La destrucción selectiva de una célula individual o de un tipo celular específico con frecuencia resulta deseable en una diversidad de contextos clínicos. Por ejemplo, es un objetivo primario de la terapia del cáncer destruir específicamente células tumorales, dejando intactas y sin daños las células y tejidos sanos.

Un modo atractivo de conseguir lo anterior es mediante la inducción de una respuesta inmunológica contra el tumor, a fin de inducir que las células inmunológicas efectoras tales como células asesinas naturales (NK) o linfocitos T citotóxicos (LTC) ataquen y destruyan las células tumorales. Los LTC constituyen las células efectoras más potentes del sistema inmunológico; sin embargo, no puede resultar activadas por el mecanismo efector mediado por el dominio Fc de los anticuerpos terapéuticos convencionales.

A este respecto, los anticuerpos biespecíficos diseñados para unirse con un "brazo" a un antígeno de superficie sobre las células diana y con el segundo "brazo" a un componente invariante activador del complejo de receptores de células T (RCT), han suscitado interés en los últimos años. La unión simultánea de dicho anticuerpo a sus dos dianas fuerza una interacción temporal entre la célula diana y la célula T, provocando la activación de cualquier célula T citotóxica y la posterior lisis de la célula diana. Por lo tanto, la respuesta inmunológica se redirige a las células diana y es independiente de la presentación de los péptidos antigénicos por parte de las células diana o la especificidad de las células T, tal como sería relevante para la activación normal restringida al CMH de los LTC. En el presente contexto resulta crucial que los LTC sólo resulten activados en el caso de que la célula diana les presente el anticuerpo biespecífico, es decir, de que se imite la sinapsis inmunológica. Resultan particularmente deseables los anticuerpos biespecíficos que no

requieren el preacondicionamiento o coestimulación de los linfocitos con el fin de inducir la lisis eficiente de las células diana.

Se han desarrollado varios formatos de anticuerpo biespecífico y se ha investigado su idoneidad para la inmunoterapia mediada por las células T. De ellos, las moléculas denominadas BiTE (acopladores biespecíficos de células T) han sido muy bien caracterizadas y ya han demostrado ser prometedoras en la clínica (revisados en Nagorsen y Bäuerle, *Exp. Cell Res.* 317:1255-1260, 2011). Los BiTE son moléculas scFv en tándem en las que se encuentran fusionadas dos moléculas de scFv mediante un conector flexible. Entre los formatos biespecíficos adicionales que se evalúan para la unión a las células T se incluyen los diacuerpos (Holliger et al., *Prot. Eng.* 9:299-305, 1996) y derivados de los mismos, tales como diacuerpos en tándem (Kipriyanov et al., *J. Mol. Biol.* 293:41-66, 1999). Un desarrollo más reciente son las moléculas denominadas DART (redireccionadoras de doble afinidad), las cuales se basan en el formato de diacuerpos pero presentan un puente disulfuro C-terminal para una estabilización adicional (Moore et al., *Blood* 117:4542-51, 2011). Los denominados triomab, que son moléculas híbridas completas de IgG de ratón/rata y que también se están evaluando actualmente en ensayo clínico, representan un formato de mayor tamaño (revisadas en Seimetz et al., *Cancer Treat. Rev.* 36:458-467, 2010).

La diversidad de formatos que se está desarrollado muestran el gran potencial atribuido al redireccionamiento y activación de las células T en la inmunoterapia. La tarea de generar anticuerpos biespecíficos adecuados para la misma, sin embargo, en modo alguno es trivial sino que implica varios retos que deben alcanzarse relacionados con la eficacia, la toxicidad, la aplicabilidad y producibilidad de los anticuerpos.

Algunos constructos pequeños tales como, por ejemplo, las moléculas BiTE, aunque son capaces de entrecruzar eficientemente las células efectoras y las células diana, presentan una semivida en suero muy corta que requiere que sean administradas en los pacientes mediante infusión continua. Por otra parte, los formatos de tipo IgG, aunque presentan el gran beneficio de una semivida prolongada, adolecen de la toxicidad asociada a las funciones efectoras nativas inherentes a las moléculas de IgG. Su potencial inmunogénico constituye otra característica desfavorable de los anticuerpos biespecíficos de tipo IgG, especialmente los formatos no humanos, para el desarrollo terapéutico con éxito. Finalmente, un reto importante en el desarrollo general de los anticuerpos biespecíficos ha sido la producción de constructos de anticuerpo biespecífico en una cantidad y pureza clínicamente suficientes, debido al emparejamiento incorrecto de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo de diferentes especificidad tras la coexpresión, reduciendo el

rendimiento del constructo correctamente ensamblado y que resulta en varios productos secundarios no funcionales respecto de los cuales puede resultar difícil separar el anticuerpo biespecífico deseado.

Se han adoptado diferentes enfoques para superar el problema de la asociación de las cadenas en los anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, Klein et al., mAbs 6:653-663, 2012). Por ejemplo, la estrategia de “botón en ojal” está destinada a forzar el apareamiento de las cadenas pesadas de dos anticuerpos diferentes mediante la introducción de mutaciones en los dominios CH3 para modificar la interfaz de contacto. En una cadena se sustituyen aminoácidos voluminosos por aminoácidos con cadenas laterales cortas, para crear un “ojal”. A la inversa, se introducen aminoácidos con cadenas laterales grandes en el otro dominio CH3, para crear un “botón”. Mediante la coexpresión de estas dos cadenas pesadas (y de dos cadenas ligeras idénticas, que deben ser apropiadas para ambas cadenas pesadas), se han observado rendimientos elevados de heterodímeros (“botón-ojal”) frente a la formación de homodímeros (“ojal-ojal” o “botón-botón”) (Ridgway J.B. et al., Protein Eng. 9:617-621, 1996, y el documento n° WO 96/027011). El porcentaje de heterodímeros podría incrementarse adicionalmente mediante el remodelaje de las superficies de interacción de los dos dominios CH3 utilizando un enfoque de expresión fágica e introduciendo un puente disulfuro para estabilizar los heterodímeros (Merchant A.M. et al., Nature Biotech. 16:677-681, 1998; Atwell S. et al., J. Mol. Biol. 26-35, 1997). Se describen nuevos enfoques para la tecnología de botones-en-ojales en, por ejemplo, el documento EP n° 1870459 A1.

Sin embargo, la estrategia de 'botones en ojales' no resuelve el problema del apareamiento incorrecto de cadena pesada-cadena ligera que se produce en anticuerpos biespecíficos que comprenden diferentes cadenas ligeras para la unión a diferentes antígenos diana.

Una estrategia para prevenir el apareamiento incorrecto de cadena pesada-cadena ligera es intercambiar dominios entre las cadenas pesada y ligera de uno de los brazos de unión de un anticuerpo biespecífico (ver los documentos n° WO 2009/080251, n° WO 2009/080252, n° WO 2009/080253 y n° WO 2009/080254, y Schaefer W. et al., PNAS 108:11187-11191, 2011, referidos a anticuerpos IgG biespecíficos con un entrecruzamiento de dominios).

El intercambio de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera VH y VL en uno de los brazos de unión del anticuerpo biespecífico (documento n° WO 2009/080252; ver también Schaefer W. et al., PNAS 108:11187-11191, 2011) claramente reduce los

productos secundarios causados por el apareamiento incorrecto de una cadena ligera contra un primer antígeno con la cadena pesada incorrecta contra el segundo antígeno (en comparación con enfoques sin dicho intercambio de dominios). Sin embargo, estas preparaciones de anticuerpos no se encuentran completamente libres de productos secundarios. El producto secundario principal se basa en una interacción de tipo Bence-Jones (Schaefer W. et al., PNAS 108:11187-11191, 2011, en la fig. S1I del Suplemento). De esta manera, todavía resulta deseable una reducción adicional de dichos productos secundarios para mejorar, por ejemplo, el rendimiento de dichos anticuerpos biespecíficos.

La elección de antígenos diana y ligantes apropiados tanto para el antígeno de células T como el antígeno celular diana es un aspecto crucial adicional en la generación de anticuerpos biespecíficos de células T (CTB) para la aplicación terapéutica. El antígeno carcinoembrionario (ACE) es un antígeno diana atractivo ya que la prevalencia de la expresión del ACE es generalmente elevada en los tumores, aunque baja en los tejidos normales. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se han generado numerosos anticuerpos contra dicha diana, uno de los cuales es el anticuerpo murino T84.66 (Wagener et al., J. Immunol. 130:2308, 1983; Neumaier et al., J. Immunol. 135:3604, 1985), que también ha sido quimerizado documento nº WO 1991/01990) y humanizado (documento nº WO 2005/086875). El documento nº WO 2007/071426 o nº WO 2014/131712 describe anticuerpos biespecíficos con diana en CD3 sobre las células T y el antígeno carcinoembrionario (ACE) sobre las células diana.

La presente invención proporciona nuevas moléculas biespecíficas mejoradas de unión a antígeno diseñadas para la activación y redireccionamiento de las células T con diana en CD3 y ACE, que combina una buena eficacia y producibilidad con una baja toxicidad y propiedades farmacocinéticas favorables.

Descripción resumida de la invención

Los presentes inventores han desarrollado una nueva molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T con propiedades mejoradas inesperadas utilizando un nuevo anticuerpo anti-ACE humanizado.

De esta manera, en un primer aspecto la presente invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, que comprende:

(a) una primera fracción de unión a antígeno que se une específicamente a un primer antígeno,

(b) una segunda fracción de unión a antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno,

en la que el primer antígeno es un antígeno de células T activador y el segundo antígeno es el ACE, o el primer antígeno es el ACE y el segundo antígeno es un antígeno de células T activador, y en el que la fracción de unión a antígeno que se une específicamente a ACE comprende una región variable de cadena pesada, particularmente una región variable de cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada (RDCP) 1 de SEC ID nº 14, la RDCP 2 de SEC ID nº 15 y la RDCP 3 de SEC ID nº 16 y una región variable de cadena ligera, particularmente una región variable de cadena ligera humanizada que comprende la región determinante de complementariedad de cadena ligera (RDCL) 1 de SEC ID nº 17, la RDCL 2 de SEC ID nº 18 y la RDCP 3 de SEC ID nº 19.

En una realización, la fracción de unión a antígeno que se une específicamente a ACE comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 23.

En realizaciones particulares, la primera y/o la segunda fracciones de unión a antígeno es una molécula Fab. En una realización particular, la segunda fracción de unión a antígeno es una molécula Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y en el que los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se sustituyen una por otra (es decir, según dicha realización, la segunda molécula de Fab es una molécula de Fab cruzada en la que los dominios variables o constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian).

En realizaciones particulares, la primera (y la tercera, en caso de existir) molécula de Fab es una molécula de Fab convencional. En una realización particular adicional, no más de una molécula de Fab capaz de unión específica a un antígeno activador de célula T se encuentra presente en la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T (es decir, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T proporciona una unión monovalente al antígeno activador de células T).

En una realización, el primer antígeno es ACE y el segundo antígeno es un antígeno de células T activador. En una realización más específica, el antígeno activador de células T es CD3, particularmente CD3-epsilon.

En una realización particular, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención comprende:

(a) una primera molécula Fab que se une específicamente a un primer antígeno,
 (b) una segunda molécula de Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y
 en la que los dominios variables VL y VH o los dos dominios constantes CL y CH1 de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se sustituyen uno por otro,
 en la que el primer antígeno es ACE y el segundo antígeno es un antígeno de células T activador, en el que la primera molécula de Fab en (a) comprende una región variable de cadena pesada, particularmente una región variable de cadena pesada humanizado, que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada (RDCP) 1 de SEC ID nº 14, la RDCP 2 de SEC ID nº 15 y la RDCP 3 de SEC ID nº 16 y una región variable de cadena ligera, particularmente una región variable de cadena ligera humanizada que comprende la región determinante de complementariedad de cadena ligera (RDCL) 1 de SEC ID nº 17, la RDCL 2 de SEC ID nº 18 y la RDCP 3 de SEC ID nº 19.

Según un aspecto adicional de la invención, la proporción entre un anticuerpo biespecífico deseado y productos secundarios no deseados, en particular productos secundarios de tipo Bence Jones presentes en los anticuerpos biespecíficos con un intercambio de dominios VH/VL en uno de los brazos de unión, puede mejorarse mediante la introducción de aminoácidos cargados con las cargas opuestas en posiciones aminoácidas específicas en los dominios CH1 y CL (en ocasiones denominados en la presente memoria "modificaciones de carga").

De esta manera, en algunas realizaciones, la primera fracción de unión a antígeno en (a) es una primera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno, la segunda fracción de unión a antígeno en (b) es una segunda molécula de Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, en el que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se sustituyen una por otra,

y

i) en el dominio constante CL de la primera molécula Fab bajo a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la primera

molécula Fab bajo a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat), o

- ii) en el dominio constante CL de la segunda molécula Fab bajo b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda molécula Fab bajo b) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una de dichas realizaciones, en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)) y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización adicional, en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En todavía otra realización, en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab bajo a), el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización particular, en el que en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab bajo a), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).

En otra realización particular, en el que en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por arginina (R) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab bajo a), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización alternativa, en el dominio constante CL de la segunda molécula de Fab en b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)) y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda molécula de Fab en b) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización adicional, en el dominio constante CL de la segunda molécula de Fab bajo b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 de la segunda molécula de Fab bajo b) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En todavía otra realización, en el dominio constante CL de la segunda molécula de Fab bajo b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda molécula de Fab bajo b), el

aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización, en el dominio constante CL de la segunda molécula de Fab bajo b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda molécula de Fab bajo b), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).

En otra realización, en el dominio constante CL de la segunda molécula de Fab bajo b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por arginina (R) (numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda molécula de Fab bajo b), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización particular, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención comprende:

- (a) una primera molécula Fab que se une específicamente a un primer antígeno,
- (b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera Fab y la cadena pesada Fab se sustituyen uno por otro, en la que el primer antígeno es ACE y el segundo antígeno es un antígeno de células T activador, en el que la primera molécula de Fab en (a) comprende una región variable de cadena pesada, particularmente una región variable de cadena pesada humanizado, que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada (RDCP) 1 de SEC ID nº 14, la RDCP 2 de SEC ID nº 15 y la RDCP 3 de SEC ID nº 16 y una región variable de cadena ligera, particularmente una región variable de cadena ligera humanizada que comprende la región determinante de complementariedad de cadena ligera (RDCL) 1 de SEC ID nº 17, la RDCL 2 de SEC ID nº 18 y la RDCL 3 de SEC ID nº 19, y en la que en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)) y el

aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab bajo a), el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T según la invención comprende además una tercera fracción de unión a antígeno que se une específicamente al primer antígeno. En realizaciones particulares, la tercera fracción de unión a antígeno es idéntica a la primera fracción de unión a antígeno. En una realización, la tercera fracción de unión a antígeno es una molécula de Fab.

En realizaciones particulares, la tercera y la primera fracciones de unión a antígeno son, cada una, una molécula de Fab y la tercera molécula de Fab es idéntica a la primera molécula de Fab. En dichas realizaciones, la tercera molécula de Fab comprende las mismas sustituciones de aminoácidos, en caso de haber alguna, que la primera molécula de Fab. Al igual que la primera molécula de Fab, la tercera molécula de Fab particularmente es una molécula de Fab convencional.

En el caso de que se encuentre presente una tercera fracción de unión a antígeno, en una realización particular la primera y tercera fracciones de unión a antígeno se unen a ACE y la segunda fracción de unión a antígeno se une específicamente a un antígeno de célula T activador, particularmente CD3, más particularmente CD3 epsilon.

En algunas realizaciones de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención, la primera fracción de unión a antígeno en a) y la segunda fracción de unión a antígeno en b) se fusionan entre sí, opcionalmente mediante un conector peptídico. En realizaciones particulares, la primera y/o la segunda fracciones de unión a antígeno son, cada una, una molécula de Fab. En una de dichas realizaciones específicas, la segunda molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab. En una realización alternativa de dichas realizaciones, la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab. En realizaciones en las que (i) la segunda molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de

Fab de la primera molécula de Fab, o (ii) la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab, además la cadena ligera de Fab de la molécula de Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab pueden fusionarse entre sí, opcionalmente mediante un conector peptídico.

En realizaciones particulares, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende además un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades capaces de asociación estable.

La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención puede presentar diferentes configuraciones, es decir, la primera, segunda (y opcionalmente tercera) fracciones de unión a antígeno pueden fusionarse entre sí y al dominio Fc de diferentes maneras. Los componentes pueden fusionarse entre sí directamente o, preferentemente, mediante uno o más conectores peptídicos adecuados. En donde la fusión de una molécula de Fab es con el extremo N-terminal de una subunidad del dominio Fc, típicamente mediante una región bisagra de inmunoglobulina.

En una realización, la primera y la segunda fracciones de unión a antígeno son, cada una, una molécula de Fab y la segunda fracción de unión a antígeno se fusionan en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En dicha realización, la primera fracción de unión a antígeno puede fusionarse en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda fracción de unión a antígeno o con el extremo N-terminal de la otra subunidad de entre las subunidades del dominio Fc.

En una realización, la primera y la segunda fracciones de unión a antígeno son, cada una, una molécula de Fab y la primera y segunda fracciones de unión a antígeno se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc. En dicha realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T esencialmente comprende una molécula de inmunoglobulina, en la que en uno de los brazos de Fab, las regiones variables de cadenas pesada y ligera VH y VL (o las regiones constantes CH1 y CL en realizaciones en las que no se introducen modificaciones de carga tal como se indica en la presente memoria en los dominios CH1 y CL) se intercambian/sustituyen una por otra (ver la figura 1A, D).

En realizaciones alternativas, una tercera fracción de unión a antígeno, en particular una tercera molécula de Fab, se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la primera o segunda subunidades del dominio Fc. En una realización particular de entre dichas realizaciones, la segunda y tercera moléculas de fracción de unión a antígeno se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc y la primera fracción de unión a antígeno se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab. En dicha realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T esencialmente comprende una molécula de inmunoglobulina, en la que en uno de los brazos de Fab, las regiones variables de cadenas pesada y ligera VH y VL (o las regiones constantes CH1 y CL en realizaciones en las que no se introducen modificaciones de carga tal como se indica en la presente memoria en los dominios CH1 y CL) se intercambian/sustituyen una por otra y en la que una molécula de Fab (convencional) adicional se fusiona N-terminalmente con dicho brazo de Fab (ver la figura 1B, E). En otra realización de entre dichas realizaciones, la primera y tercera fracciones de unión a antígeno se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc y la segunda fracción de unión a antígeno se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera fracción de unión a antígeno. En dicha realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T esencialmente comprende una molécula de inmunoglobulina con una molécula de Fab adicional fusionada N-terminalmente con uno de los brazos de Fab de inmunoglobulina, en la que en dicha molécula de Fab adicional, las regiones variables de cadenas pesada y ligera VH y VL (o las regiones constantes CH1 y CL en realizaciones en las que no se introducen modificaciones de carga tal como se indica en la presente memoria en los dominios CH1 y CL) se intercambian/sustituyen una por otra (ver la figura 1C, F).

En una realización particular, la molécula de inmunoglobulina comprendida en la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención es una inmunoglobulina de clase IgG. En una realización todavía más particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG₁. En otra realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG₄.

En una realización particular, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, que comprende:

a) una primera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno,

(b) una segunda molécula de Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y en la que los dominios variables VL y VH o los dos dominios constantes CL y CH1 de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se sustituyen uno por otro,

c) una tercera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno, y

d) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades capaces de asociación estable, en la que el primer antígeno es ACE y el segundo antígeno es un antígeno activador de células T, particularmente CD3, más particularmente CD3 epsilon, en la que la tercera molécula de Fab bajo c) es idéntica a la primera molécula de Fab bajo a),

en la que:

(i) la primera molécula de Fab bajo a) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab bajo b), y la segunda molécula de Fab bajo b) y la tercera molécula de Fab bajo c) se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de las subunidades del dominio Fc bajo d), o

(ii) la segunda molécula de Fab en b) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab en a), y la primera molécula de Fab en a) y la tercera molécula de Fab en

c) se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de las subunidades del dominio Fc en d), y

en el que la primera molécula de Fab en (a) y la tercera molécula de Fab en c) comprende una región variable de cadena pesada, particularmente una región variable de cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada (RDCP) 1 de SEC ID nº 14, la RDCP 2 de SEC ID nº 15 y la RDCP 3 de SEC ID nº 16 y una región variable de cadena ligera, particularmente una región variable de cadena ligera humanizada que comprende la región determinante de complementariedad de cadena ligera (RDCL) 1 de SEC ID nº 17, la RDCL 2 de SEC ID nº 18 y la RDCP 3 de SEC ID nº 19.

En otra realización, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, que comprende:

a) una primera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno,

(b) una segunda molécula de Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y en la que los dominios variables VL y VH o los dos dominios constantes CL y CH1 de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se sustituyen uno por otro,

c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades capaces de asociación estable, en la que el primer antígeno es ACE y el segundo antígeno es un antígeno activador de células T, particularmente CD3, más particularmente CD3 epsilon, en la que:

(i) la primera molécula de Fab en a) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab en b), y la segunda molécula de Fab en b) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc en c), o

(ii) la segunda molécula de Fab en b) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab en a), y la primera molécula de Fab en a) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc en c), y en el que la primera molécula de Fab en a) comprende una región variable de cadena pesada, particularmente una región variable de cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada (RDCP) 1 de SEC ID nº 14, la RDCP 2 de SEC ID nº 15 y la RDCP 3 de SEC ID nº 16 y una región variable de cadena ligera, particularmente una región variable de cadena ligera humanizada que comprende la región determinante de complementariedad de cadena ligera (RDCL) 1 de SEC ID nº 17, la RDCL 2 de SEC ID nº 18 y la RDCP 3 de SEC ID nº 19.

En una realización adicional, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, que comprende:

a) una primera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno,

b) una segunda molécula de Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y en la que los dominios variables VL y VH o los dos dominios constantes CL y CH1 de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se sustituyen uno por otro, y

c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades capaces de asociación estable,

en la que:

(i) el primer antígeno es ACE y el segundo antígeno es un antígeno activador de células T, particularmente CD3, más particularmente CD3 epsilon, o

ii) el segundo antígeno es ACE y el primer antígeno es un antígeno activador de células T, particularmente CD3, más particularmente CD3 epsilon, en la que la primera molécula de Fab en a) y la segunda molécula de Fab en b) se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc en c), y en el que la molécula de Fab que se une específicamente a ACE comprende una región variable de cadena pesada, particularmente una región variable de cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada (RDCP) 1 de SEC ID nº 14, la RDCP 2 de SEC ID nº 15 y la RDCP 3 de SEC ID nº 16 y una región variable de cadena ligera, particularmente una región variable de cadena ligera humanizada que comprende la región determinante de complementariedad de cadena ligera (RDCL) 1 de SEC ID nº 17, la RDCL 2 de SEC ID nº 18 y la RDCP 3 de SEC ID nº 19.

En todas las diferentes configuraciones de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención, las sustituciones de aminoácidos indicadas en la presente memoria, en caso de hallarse presentes, pueden encontrarse en los dominios CH1 y CL de la primera y (en caso de hallarse presente) la tercera molécula de Fab, o en los dominios CH1 y CL de la segunda molécula de Fab. Preferentemente se encuentran en los dominios CH1 y CL de la primera y (en caso de hallarse presente) la tercera molécula de Fab. Según el concepto de la invención, en el caso de que se realicen sustituciones de aminoácidos tal como se indica en la presente memoria en la primera (y, en caso de hallarse presente, la tercera) molécula de Fab, no se realizan ninguna de dichas sustituciones de aminoácidos en la segunda molécula de Fab. A la inversa, en el caso de que se realicen sustituciones de aminoácidos tal como se indica en la presente memoria en la segunda molécula de Fab, no se realizan ninguna de dichas sustituciones de aminoácidos en la primera (y, en caso de hallarse presente, la tercera) molécula de Fab. No se realizó ninguna sustitución de aminoácido en las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T que comprenden una molécula de Fab, en las que los dominios constantes CL y CH1 de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se sustituyen unos por otros.

En realizaciones particulares de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención, particularmente en la que las sustituciones de aminoácidos tales como las descritas en la presente memoria se realizan en la primera (y, en caso de hallarse presente, la tercera) molécula de Fab, el dominio constante CL de la primera (y, en caso de hallarse presente, la tercera) molécula de Fab es del isotipo kappa. En otras realizaciones de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención, particularmente en la que las sustituciones de aminoácidos tales como las descritas en la presente memoria se realizan en la segunda molécula de Fab, el dominio constante CL de la segunda molécula de Fab es del isotipo kappa. En algunas realizaciones, el dominio constante CL de la primera (y, en caso de hallarse presente, la tercera) molécula de Fab y el dominio constante CL de la segunda molécula de Fab son del isotipo kappa.

En una realización particular, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, que comprende:

- a) una primera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno,
- b) una segunda molécula de Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se sustituyen uno por otro,
- c) una tercera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno, y
- d) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades capaces de asociación estable, en la que el primer antígeno es ACE y el segundo antígeno es un antígeno activador de células T, particularmente CD3, más particularmente CD3 epsilon, en la que la tercera molécula de Fab bajo c) es idéntica a la primera molécula de Fab bajo a), en la que en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab en a) y la tercera molécula de Fab en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por lisina (K) o arginina (R) (numeración según Kabat) y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab en a) y la tercera molécula de Fab en c), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat),
en la que:

(i) la primera molécula de Fab bajo a) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab bajo b), y la segunda molécula de Fab bajo b) y la tercera molécula de Fab bajo c) se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de las subunidades del dominio Fc bajo d), o

(ii) la segunda molécula de Fab en b) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab en a), y la primera molécula de Fab en a) y la tercera molécula de Fab en c) se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de las subunidades del dominio Fc en d), y en el que la primera molécula de Fab en (a) y la tercera molécula de Fab en c) comprende una región variable de cadena pesada, particularmente una región variable de cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada (RDCP) 1 de SEC ID nº 14, la RDCP 2 de SEC ID nº 15 y la RDCP 3 de SEC ID nº 16 y una región variable de cadena ligera, particularmente una región variable de cadena ligera humanizada que comprende la región determinante de complementariedad de cadena ligera (RDCL) 1 de SEC ID nº 17, la RDCL 2 de SEC ID nº 18 y la RDCP 3 de SEC ID nº 19.

En una realización todavía más particular, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, que comprende:

a) una primera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno,

b) una segunda molécula de Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se sustituyen uno por otro,

c) una tercera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno, y

d) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades capaces de asociación estable, en la que el primer antígeno es ACE y el segundo antígeno es un antígeno activador de células T, particularmente CD3, más particularmente CD3 epsilon, en la que la tercera molécula de Fab bajo c) es idéntica a la primera molécula de Fab bajo a), en la que en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab en a) y la tercera molécula de Fab en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por arginina (R)

(numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab en a) y la tercera molécula de Fab en c), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat), en la que la primera molécula de Fab en a) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab en b), y la segunda molécula de Fab en b) y la tercera molécula de Fab en c) se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de las subunidades del dominio Fc en d), y en el que la primera molécula de Fab en (a) y la tercera molécula de Fab en c) comprende una región variable de cadena pesada, particularmente una región variable de cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada (RDCP) 1 de SEC ID nº 14, la RDCP 2 de SEC ID nº 15 y la RDCP 3 de SEC ID nº 16 y una región variable de cadena ligera, particularmente una región variable de cadena ligera humanizada que comprende la región determinante de complementariedad de cadena ligera (RDCL) 1 de SEC ID nº 17, la RDCL 2 de SEC ID nº 18 y la RDCP 3 de SEC ID nº 19.

En otra realización, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, que comprende:

- a) una primera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno,
- b) una segunda molécula de Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se sustituyen uno por otro,
- c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades capaces de asociación estable, en la que el primer antígeno es ACE y el segundo antígeno es un antígeno activador de células T, particularmente CD3, más particularmente CD3 epsilon, en la que en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por lisina (K) o arginina (R) (numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab en a), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat),
en la que:

(i) la primera molécula de Fab en a) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab en b), y la segunda molécula de Fab en b) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc en c), o

(ii) la segunda molécula de Fab en b) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab en a), y la primera molécula de Fab en a) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc en c), y en el que la primera molécula de Fab en a) comprende una región variable de cadena pesada, particularmente una región variable de cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada (RDCP) 1 de SEC ID nº 14, la RDCP 2 de SEC ID nº 15 y la RDCP 3 de SEC ID nº 16 y una región variable de cadena ligera, particularmente una región variable de cadena ligera humanizada que comprende la región determinante de complementariedad de cadena ligera (RDCL) 1 de SEC ID nº 17, la RDCL 2 de SEC ID nº 18 y la RDCP 3 de SEC ID nº 19.

En una realización adicional, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, que comprende:

a) una primera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno,

b) una segunda molécula de Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se sustituyen uno por otro, y

c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades capaces de asociación estable,

en la que:

(i) el primer antígeno es ACE y el segundo antígeno es un antígeno activador de células T, particularmente CD3, más particularmente CD3 epsilon, o

(ii) el segundo antígeno es ACE y el primer antígeno es un antígeno activador de células T, particularmente CD3, más particularmente CD3 epsilon,

en la que en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por lisina (K) o arginina (R) (numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab en a), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat),

en la que la primera molécula de Fab en a) y la segunda molécula de Fab en b) se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc en c), y en el que la molécula de Fab que se une específicamente a ACE comprende una región variable de cadena pesada, particularmente una región variable de cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada (RDCP) 1 de SEC ID nº 14, la RDCP 2 de SEC ID nº 15 y la RDCP 3 de SEC ID nº 16 y una región variable de cadena ligera, particularmente una región variable de cadena ligera humanizada que comprende la región determinante de complementariedad de cadena ligera (RDCL) 1 de SEC ID nº 17, la RDCL 2 de SEC ID nº 18 y la RDCP 3 de SEC ID nº 19.

En realizaciones particulares de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG. En una realización específica, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En otra realización específica, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄. En una realización todavía más específica, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄ que comprende la sustitución de aminoácidos S228P (numeración de Kabat). En realizaciones particulares, el dominio Fc es un dominio Fc humano.

En realizaciones particulares, el dominio Fc comprende una modificación que estimula la asociación de la primera y la segunda subunidades del dominio Fc. En una realización específica de dichas realizaciones, un residuo aminoácido en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc se sustituye por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral mayor, generando de esta manera una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que es posicionable en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y un residuo aminoácido en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se sustituye por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral menor, generando de esta manera una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la que puede posicionarse la protuberancia del dominio CH3 de la primera subunidad.

En una realización particular, el dominio Fc muestra una afinidad de unión reducida a un receptor de Fc y/o una función efectora reducida en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa. En determinadas realizaciones, el dominio Fc se manipula para que presente una afinidad de unión reducida a un receptor de Fc y/o una función efectora reducida en comparación con un dominio Fc no manipulado. En una realización, el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora. En una realización, la sustitución o sustituciones de aminoácidos en el dominio Fc que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora se encuentra en una o más posiciones seleccionadas de entre el grupo de L234, L235 y P329 (numeración según el índice EU de Kabat). En realizaciones particulares, cada subunidad del dominio Fc comprende tres sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora, en la que dichas sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A y P329G (numeración según el índice EU de Kabat). En una de dichas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, particularmente un dominio Fc de IgG₁ humana. En otras realizaciones, cada subunidad del dominio Fc comprende dos sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora, en la que dichas sustituciones de aminoácidos son L235E y P329G (numeración según el índice EU de Kabat). En una de dichas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄, particularmente un dominio Fc de IgG₄ humana. En una realización, el dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T es un dominio Fc de IgG₄ y comprende las sustituciones de aminoácidos L235E y S228P (SPLE) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ. En una realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En una realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. En una realización específica, el receptor de Fc es FcγRIIa, FcγRI y/o FcγRIIIa humano. En una realización, la función efectora es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).

En una realización específica de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención, la fracción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de células T activador, particularmente CD3, más particularmente CD3 epsilon, comprende una región variable de cadena pesada que comprende la región determinante de complementariedad (RDC) de cadena pesada 1 de SEC ID nº 4, la RDCP 2 de SEC ID nº 5, la RDCP 3 de SEC ID nº 6 y una región variable de cadena ligera que comprende la región determinante de complementariedad de cadena ligera (RDCL) 1 de SEC ID nº 8, la RDCL 2 de SEC ID nº 9 y la RDCP 3 de SEC ID nº 10. En una realización todavía más específica, la fracción de unión a antígeno que se une

específicamente a un antígeno de células T activador, particularmente CD3, más particularmente CD3 epsilon, comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7. En dichas realizaciones, la fracción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de célula T es una molécula de Fab. En una realización específica, la segunda fracción de unión a antígeno, en particular molécula de Fab, comprendida en la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención se une específicamente a CD3, más particularmente a CD3 epsilon, y comprende la región determinante de complementariedad (RDC) de cadena pesada 1 de SEC ID nº 4, la CDR 2 de cadena pesada de SEC ID nº 5, la CDR 3 de cadena pesada de SEC ID nº 6, la CDR 1 de cadena ligera de SEC ID nº 8, la CDR 2 de cadena ligera de SEC ID nº 9 y la CDR 3 de cadena ligera de SEC ID nº 10. En una realización todavía más específica, dicha segunda fracción de unión a antígeno, en particular molécula de Fab, comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7.

En una realización específica adicional de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención, la fracción de unión a antígeno, que se une específicamente a ACE comprende la región determinante de complementariedad (RDC) de cadena pesada 1 de SEC ID nº 14, la CDR 2 de cadena pesada de SEC ID nº 15, la CDR 3 de cadena pesada de SEC ID nº 16, la CDR 1 de cadena ligera de SEC ID nº 17, la CDR 2 de cadena ligera de SEC ID nº 18 y la CDR 3 de cadena ligera de SEC ID nº 19. En una realización todavía más específica, la fracción de unión a antígeno, en particular la molécula de Fab, que se une específicamente a ACE, comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 23. En una realización específica, la primera (y, en caso de hallarse presente, la tercera) fracción de unión a antígeno, en particular molécula de Fab, comprendida en la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención se une específicamente a ACE, y comprende la región determinante de complementariedad (RDC) de cadena pesada 1 de SEC ID nº 14, la CDR 2 de cadena pesada de SEC ID nº 15, la CDR 3 de cadena pesada

de SEC ID nº 16, la CDR 1 de cadena ligera de SEC ID nº 17, la CDR 2 de cadena ligera de SEC ID nº 18 y la CDR 3 de cadena ligera de SEC ID nº 19. En una realización todavía más específica, dicha primera (y, en caso de hallarse presente, dicha tercera) fracción de unión a antígeno, en particular molécula de Fab, comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 23.

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, que comprende:

a) una primera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno,

(b) una segunda molécula de Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y en la que los dominios variables VL y VH o los dos dominios constantes CL y CH1 de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se sustituyen uno por otro,

c) una tercera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno, y

d) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades capaces de asociación estable,

en la que:

(i) el primer antígeno es ACE y el segundo antígeno es CD3, particularmente CD3 epsilon,

(ii) la primera molécula de Fab bajo a) y la tercera molécula de Fab bajo c) comprenden, cada una, la región determinante de complementariedad (RDC) de cadena pesada 1 de SEC ID nº 14, la CDR 2 de cadena pesada de SEC ID nº 15, la CDR 3 de cadena pesada de SEC ID nº 16, la CDR 1 de cadena ligera de SEC ID nº 17, la CDR 2 de cadena ligera de SEC ID nº 18 y la CDR 3 de cadena ligera de SEC ID nº 19, y la segunda molécula de Fab bajo b) comprende la RDC de cadena pesada 1 de SEC ID nº 4, la CDR 2 de cadena pesada de SEC ID nº 5, la CDR 3 de cadena pesada de SEC ID nº 6, la CDR 1 de cadena ligera de SEC ID nº 8, la CDR 2 de cadena ligera de SEC ID nº 9 y la CDR 3 de cadena ligera de SEC ID nº 10, y

(iii) la primera molécula de Fab en a) se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab en b), y la segunda molécula de Fab en b) y la tercera molécula de Fab en c) se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En una realización, en la segunda molécula de Fab en b) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro y además (iv) en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab en a) y la tercera molécula de Fab en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por lisina (K) o arginina (R), particularmente por arginina (R) (numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab en a) y la tercera molécula de Fab en c), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).

Según otro aspecto de la invención se proporciona uno o más polinucleótidos aislados codificantes de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención. La invención proporciona además uno o más vectores de expresión que comprenden el polinucleótido o polinucleótidos aislados de la invención y una célula huésped que comprende el polinucleótido o polinucleótidos aislados o el vector o vectores de expresión de la invención. En algunas realizaciones la célula huésped es una célula eucariótica, particularmente una célula de mamífero.

En otro aspecto se proporciona un método de producción de molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención, que comprende las etapas de a) cultivar la célula huésped de la invención bajo condiciones adecuadas para la expresión de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T y b) recuperar la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T. La invención comprende además una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T producida mediante el método de la invención.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención comprende además métodos de utilización de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T y composición farmacéutica de la invención. En un aspecto, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T o una composición farmacéutica de la invención para la utilización a modo de medicamento. En un aspecto se proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T o una composición farmacéutica según la

invención para la utilización en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo requiere. En una realización específica la enfermedad es el cáncer.

Se proporciona además la utilización de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo requiere, así como un método de tratamiento de un individuo, que comprende administrar en dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En una realización específica la enfermedad es el cáncer. En cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas el individuo preferentemente es un mamífero, particularmente un ser humano.

La invención proporciona además un método para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, que comprende poner en contacto una célula diana y una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención en presencia de una célula T, particularmente una célula T citotóxica.

Breve descripción de los dibujos

FIGURA 1. Configuraciones ejemplares de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno (CTB) activadoras de células T. (A, D) Ilustración de la molécula "1+1 CrossMab". (B, E) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con orden alternante de los componentes Crossfab y Fab ("invertida"). (C, F) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab". (G, K) Ilustración de la molécula "1+1 IgG Crossfab" con orden alternante de los componentes Crossfab y Fab ("invertida"). (H, L) Ilustración de la molécula "1+1 IgG Crossfab". (I, M) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con dos CrossFab. (J, N) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con dos CrossFab con orden alternante de los componentes Crossfab y Fab ("invertida"). (O, S) Ilustración de la molécula "Fab-CrossFab". (P, T) Ilustración de la molécula "Crossfab-Fab". (Q, U) Ilustración de la molécula "(Fab)₂-CrossFab". (R, V) Ilustración de la molécula "Crossfab-(Fab)₂". (W, Y) Ilustración de la molécula "Fab-(Crossfab)₂". (X, Z) Ilustración de la molécula "(Crossfab)₂-Fab". Punto negro: modificación opcional en el dominio Fc que estimula la heterodimerización. ++, --: aminoácidos de cargas opuestas introducidos opcionalmente en los dominios CH1 y CL. Las moléculas de Fab cruzado se ilustran como comprendiendo un intercambio de regiones VH y VL, pero pueden, en realizaciones en las que no se introducen modificaciones de carga en los dominios CH1 y CL, comprender alternativamente un intercambio de los dominios CH1 y CL.

FIGURA 2. Unión de diferentes variantes humanizadas de IgG T84.66 a células. Se calcularon los valores de EC_{50} , basados en las curvas de unión, con Graph Pad Prism y se presentan en la Tabla 1.

FIGURA 3. Ilustración de las CBT preparadas los Ejemplos. (A, B) Ilustración de las moléculas de CBT “2+1 IgG CrossFab, invertido” anti-ACE/anti-CD3 con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en el ligante de CD3, modificación de carga en el ligante de ACE, moléculas A y B). (C) Ilustración de las moléculas de CBT “1+1 IgG CrossFab, invertido” anti-ACE/anti-CD3 con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en el ligante de CD3, modificación de carga en el ligante de ACE, molécula C). (D) Ilustración de las moléculas de CBT “1+1 IgG CrossMab” anti-ACE/anti-CD3 con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en el ligante de CD3, modificación de carga en el ligante de ACE, molécula D). (E) Ilustración de las moléculas de CBT “2+1 IgG CrossFab, invertido” anti-ACE/anti-CD3 con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en el ligante de CD3, modificación de carga en el ligante de ACE, molécula E). (F) Ilustración de las moléculas de CBT “2+1 IgG CrossFab, invertido” anti-ACE/anti-CD3 sin modificaciones de carga (intercambio VH/VL en el ligante de CD3, molécula F). EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K.

FIGURA 4. Análisis de EC-SDS de las moléculas de CTB preparadas en los ejemplos (preparaciones purificadas finales). (A) Electroferograma de “2+1 IgG CrossFab, invertido” con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en ligante de CD3, modificación de carga en ligante de ACE, ligante de ACE murino parental (T84.66); molécula A). (B) Electroferograma de “2+1 IgG CrossFab, invertido” con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en ligante de CD3, modificación de carga en ligante de ACE, ligante de ACE humanizado; molécula B). (C) Electroferograma de “1+1 IgG CrossFab, invertido” con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en ligante de CD3, modificación de carga en ligante de ACE, ligante de ACE humanizado; molécula C). (D) Electroferograma de “1+1 IgG CrossMab” con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en ligante de CD3, modificación de carga en ligante de ACE, ligante de ACE humanizado; molécula D). (E) Electroferograma de “2+1 IgG CrossFab, invertido” con modificaciones de carga y conector más largo (intercambio VH/VL en ligante de CD3, modificación de carga en ligante de ACE, ligante de ACE humanizado; molécula E). (F) “2+1 IgG CrossFab, invertido” sin modificaciones de carga (intercambio VH/VL en ligante CD3, ligante de ACE humanizado; molécula F). Carril A=no reducido, carril B=reducido. FIGURA 5. Unión de diferentes formatos de CTB ACE a las células, que expresan niveles elevados de ACE (MKN45, A), niveles intermedios de ACE (LS174T, B) o niveles bajos de ACE (HT29, C) o

CD3 humano (células Jurkat, D). Se ilustran las medianas de intensidad de fluorescencia (MIF). Las barras de error indican DE de las muestras por triplicado.

FIGURA 6. Lisis mediada por células T de células tumorales inducida por diferentes moléculas de CBT ACE CD3 medida a partir de la liberación de LDH tras 24 h (A-C) o 48 h (D-F). Se utilizaron CMSP humanas como células efectoras y células MKN45 (A, D), BxPC-3 (B, E) o HT29 (C, F) como células diana, a una proporción final de células efectoras a diana de 10:1. Se ilustran muestras por triplicado con DE. Los valores de EC_{50} se calcularon con GraphPadPrism 5 y se proporcionan en las Tablas 4 y 5.

FIGURA 7. Regulación positiva de CD25 sobre células T $CD4^+$ (A-D) y $CD8^+$ (E-H) humanas tras la lisis mediada por células T de células tumorales expresantes de ACE inducida por diferentes moléculas de CBT ACE CD3. Se utilizaron CMSP humanas como células efectoras y células MKN45 (A, E), BxPC-3 (B, F) o HT29 (C, G) como células diana, a una proporción final de células efectoras a diana de 10:1. Se muestran los resultados sin células diana en (D) y (H). Se determinó el porcentaje de células T positivas para CD25 mediante FACS tras 48 h. Se muestran observaciones por triplicado con DE.

FIGURA 8. Regulación positiva de CD69 sobre células T $CD4^+$ (A-E) y $CD8^+$ (F-J) humanas tras la coincubación con células tumorales expresantes de ACE o células epiteliales primarias y diferentes moléculas de CBT ACE CD3. Se utilizaron CMSP humanas como células efectoras y células MKN45 (A, F), BxPC-3 (B, G), HT29 (C, H) y CCD841 (D, I) como células diana, a una proporción final de células efectoras a diana de 10:1. Se muestran los resultados sin células diana en (E) y (J). Se determinó el porcentaje de células T positivas para CD69 mediante FACS tras 48 h. Se muestran observaciones por triplicado con DE.

FIGURA 9. Activación de células T y lisis de células tumorales inducidas por diferentes moléculas de CBT ACE CD3 medida mediante FACS (porcentaje de células T $CD69^+CD8^+$ (A, B)) o LDH (C, D) tras 48 h. Se utilizaron CMSP humanas como células efectoras a una proporción final de células efectoras a diana de 10:1. Las células diana eran MKN45 expresantes de un nivel elevado de ACE o células epiteliales primarias expresantes de un nivel bajo de ACE, CCD841 CoN. Además, se evaluó la activación de las células T en ausencia de dianas ("sin dianas"). Se muestran observaciones por triplicado con DE. A, C: CBT CD3 ACE con ligante de ACE T84.66 quimérico parental (molécula A), B, D: CBT CD3 ACE con ligante de ACE humanizado (variante humanizada 1; molécula B).

FIGURA 10. Ensayo de células informadoras Jurkat-NFAT para determinar la activación temprana mediada por CD3 de células Jurkat con la unión simultánea de diferentes moléculas de CBT CD3 ACE a células diana y células efectoras Jurkat. La intensidad de la activación y señalización mediada por CD3 se detectó mediante la medición de la señal relativa de luminiscencia (URL). Se muestran observaciones por triplicado con DE. (A) CTB CD3 ACE con ligante de ACE T84.66 quimérico parental (molécula A), (B) CTB CD3 ACE con ligante de ACE humanizado (variante humanizada 1; molécula B).

FIGURA 11. Activación de células T (A-D) y lisis de células tumorales (E-H) inducidos por diferentes moléculas de CBT CD3 ACE diferentes, medidas mediante FACS (A-D, porcentaje de células T CD8+ positivas para CD69) o LDH (E-H) tras 48 h. Se utilizaron CMSP humanas como células efectoras a una proporción final de efectoras a diana de 10:1. Las células diana era células BxPC-3 de expresión intermedia de ACE (A, E), células NCI-H2122 de expresión baja de ACE (B, F) o células COR-L105 de nivel de expresión de ACE muy bajo (C, G) o células epiteliales primarias HBEpiC (D, H). Se muestran observaciones por triplicado con DE.

FIGURA 12. Proliferación de células T CD8+ (A-D) y CD4+ (E-H), inducidas por diferentes moléculas de CBT CD3 ACE, medida mediante FACS tras 5 días. Se utilizaron CMSP humanas como células efectoras a una proporción final de células efectoras a diana de 10:1. Las células diana eran MKN45 expresantes de un nivel elevado de ACE (A, E), células LS174T de nivel intermedio de expresión de ACE (B, F), células HT29 de nivel de expresión baja de ACE (C, G) o células epiteliales primarias expresantes de un nivel muy bajo de ACE, CCD841 CoN (D, H). Se muestran observaciones por triplicado con DE.

FIGURA 13. Unión de diferentes moléculas de CBT CD3 ACE diferentes (molécula B y molécula E) a células MKN45 (A), L2174T (B), HT29 (C) y Jurkat (D), medida mediante FACS.

FIGURA 14. Lisis mediada por células T de células tumorales inducida por diferentes moléculas de CBT CD3 ACE (molécula B y molécula E) medida a partir de la liberación de LDH tras 24 h (A-D) o 48 h (E-H). Se utilizaron CMSP humanas como células efectoras y células MKN45 (A, E), BxPC-3 (B, F) o HT29 (C, G) , se utilizaron células HBEpiC (D, H) como células diana, a una proporción final de células efectoras a diana de 10:1. Se ilustran muestras por triplicado con DE. Los valores de EC50 se calcularon con GraphPadPrism 5 y se proporcionan en la Tabla 6.

FIGURA 15. Comparación entre la farmacocinética de la molécula de CBT CD3 ACE B y la molécula de CBT CD3 ACE X tras una única administración i.v. de bolo en ratones NOG.

FIGURA 16. Unión de diferentes moléculas de CBT CD3 ACE diferentes a ACE humana, expresada sobre células MKN45 (A), L2174T (B) y HT29 (C), o a CD3 humana, expresada sobre células Jurkat (D). Se muestran observaciones por triplicado con DE. Se calcularon los valores de EC_{50} , basados en las curvas de unión, con Graph Pad Prism y se presentan en la Tabla 6.

FIGURA 17. Determinación de lisis de células tumorales dependiente de antígeno, inducida por diferentes moléculas de CBT CD3 ACE en presencia de diversas células tumorales positivas para ACE: (A) HCC1954, (B) NCI-H596, (C) NCI-H2122, (D) Kato III, (E) CX-1. Se determinó la lisis de células tumorales mediante cuantificación de la LDH liberada a partir de células tumorales apoptóticas/necróticas. Se muestran observaciones por triplicado con DE. Se calcularon los valores de EC_{50} de lisis de células tumoral con Graph Pad Prism y se presentan en la Tabla 7.

FIGURA 18. Activación de células T dependiente de antígeno y lisis tumoral inducidos con la molécula de CBT CD3 ACE B en presencia de células diana tumorales positivas para ACE pero no en presencia de células epiteliales primarias con un nivel bajo de expresión de ACE. Se determinó la lisis de las células tumorales mediante cuantificación de la LDH liberada de células tumorales apoptóticas/necróticas (A). Se determinó la activación de las células T mediante medición de FACS de la regulación positiva del marcador de activación temprana CD69 sobre células T efectoras $CD4^+$ (B). Se muestran observaciones por triplicado con DE. Se calcularon los valores de EC_{50} de lisis de células tumorales y la activación de las células T con Graph Pad Prism y se presentan en las Tablas 9 y 11.

FIGURA 19. Activación de células T dependiente de antígeno y lisis tumoral inducidos con la molécula de CBT CD3 ACE B en presencia de células tumorales positivas para ACE pero no en presencia de células epiteliales primarias con un nivel bajo de expresión de ACE. Se determinó la lisis de las células tumorales mediante cuantificación de la LDH liberada de células tumorales apoptóticas/necróticas (A). Se determinó la activación de las células T mediante medición de FACS de la regulación positiva del marcador de activación tardía CD25 sobre células T efectoras $CD4^+$ (B). Se muestran observaciones por triplicado con DE. Se calcularon los valores de EC_{50} de lisis de células tumorales con Graph Pad Prism y se presentan en la Tabla 10.

FIGURA 20. (A) Unión de la molécula de CBT CD3 ACE B a HEK293T transfectantes transitorios, que expresan ACECAM5, ACECAM1 o ACECAM6 humanas. Se muestran observaciones por triplicado con DE. (B) La unión de un anticuerpo anti-CD66 a HEK293T transfectantes transitorios muestran la eficacia de transfección, respectivamente los niveles de expresión de los tres elementos de la familia ACECAM. Se ilustran los valores de MIF (mediana de intensidad de fluorescencia), basada en observaciones por triplicado y DE.

FIGURA 21. Actividad antitumoral de la molécula CBT CD3 ACE B frente a la molécula de CBT CD3 ACE X en el modelo de MKN45 en ratones NOG totalmente humanizados. Se sometieron a ensayo diferentes dosis y programas de administración: (A) 2,5 mg/kg dos veces/semana, (B) 2,5 mg/kg una vez/semana, (C) 0,5 mg/kg una vez/semana. La flecha negra indica el inicio de la terapia. El tratamiento se administró durante 9 semanas. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Prueba t no apareada de dos colas en el momento de finalización del estudio (día 70) ($8 < n < 9$).

FIGURA 22. FC simulada de diferentes niveles de dosis y programas utilizados en el estudio de eficacia de intervalos de dosis (Ejemplo 12). Se utilizó un modelo de 2 compartimientos y la simulación se basó en los datos de SDPK.

FIGURA 23. (A) Actividad antitumoral de la molécula CBT CD3 ACE B frente a la molécula de CBT CD3 ACE X en el modelo de MKN45 en ratones NSG totalmente humanizados. Se sometieron a ensayo diferentes dosis y programas de administración. La flecha negra indica el inicio de la terapia. El tratamiento se administró durante 4 semanas. (B) Análisis de comparaciones múltiples ANOVA bidireccional en el momento de finalización del estudio (día 38). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ ($9 < n < 14$).

FIGURA 24. Actividad antitumoral de la molécula CBT CD3 ACE B frente a la molécula de CBT CD3 ACE X (2,5 mg/kg, una vez a la semana) en el modelo HPAF-II en ratones NOG con transferencia de CMSP_hu. La flecha gris indica inyección de CMSP humanas (CMSP_hu) y la flecha negra indica el inicio de la terapia. El tratamiento se administró durante 3 semanas. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ Prueba t no apareada de dos colas en el momento de finalización del estudio (día 32) ($n = 10$).

FIGURA 25. Comparación entre la farmacocinética de la molécula de CBT CD3 ACE B y la molécula de CBT CD3 ACE X tras la administración i.v. de bolo en monos Cynomolgus. Se ilustra la farmacocinética de animales individuales representativos.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos se utilizan en la presente memoria tal como se utilizan generalmente en la técnica, a menos que se defina de otra manera a continuación.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “molécula de unión a antígeno” se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Son ejemplos de moléculas de unión a antígeno las inmunoglobulinas y derivados, por ejemplo fragmentos de las mismas.

El término "biespecífico" se refiere a que la molécula de unión a antígeno es capaz de unirse específicamente a por lo menos dos determinantes antigénicos diferentes. Típicamente una molécula biespecífica de unión a antígeno comprende dos sitios de unión a antígeno, cada uno de los cuales es específico para un determinante antigénico diferente. En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno es capaz de unirse simultáneamente a dos determinantes antigénicos, particularmente a dos determinantes antigénicos expresados sobre dos células diferentes.

El término “valente” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la presencia de un número específico de sitios de unión a antígeno en una molécula de unión a antígeno. De esta manera, la expresión "unión monovalente a un antígeno" se refiere a la presencia de un (y no más de un) sitio de unión a antígeno específico para el antígeno en la molécula de unión a antígeno.

Un "sitio de unión a antígeno" se refiere al sitio, es decir, uno o más residuos aminoácidos, de una molécula de unión a antígeno que proporciona la interacción con el antígeno. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo comprende residuos aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Una molécula de inmunoglobulina nativa típicamente presenta dos sitios de unión a antígeno; una molécula de Fab típicamente presenta un único sitio de unión a antígeno.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “fracción de unión a antígeno” se refiere a una molécula de polipéptido que se une específicamente a un determinante antigénico. En una realización, una fracción de unión a antígeno es capaz de dirigir la entidad a la que se encuentra unida (por ejemplo una segunda fracción de unión a antígeno) a un sitio diana, por ejemplo a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que porta el determinante antigénico. En otra realización, una fracción de unión a antígeno es capaz de activar la señalización mediante su antígeno diana, por ejemplo un

antígeno complejo de receptor de células T. Entre las fracciones de unión a antígeno se incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos, tal como se define adicionalmente en la presente memoria. Entre las fracciones de unión a antígeno particulares se incluyen un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo y una región variable de cadena ligera de anticuerpo. En determinadas realizaciones, las fracciones de unión a antígeno pueden comprender regiones constantes de anticuerpo tal como se definen adicionalmente en la presente memoria y son conocidas de la técnica. Entre las regiones constantes de cadena pesada que resultan útiles se incluyen cualquiera de los cinco isotipos siguientes: α , δ , ϵ , γ o μ . Entre las regiones constantes de cadena ligera que resultan útiles se incluyen cualquiera de los dos isotipos siguientes: κ y λ .

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “determinante antigénico” es sinónima de “antígeno” y “epítipo”, y se refiere a un sitio (por ejemplo un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional constituida de diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une una fracción de unión a antígeno, formando un complejo de fracción de unión a antígeno-antígeno. Pueden encontrarse determinantes antigénicos útiles, por ejemplo, sobre las superficies de las células tumorales, sobre las superficies de las células infectadas por virus, sobre las superficies de otras células enfermas, sobre la superficie de células inmunológicas, libres en suero sanguíneo, y/o en la matriz extracelular (MEC). Las proteínas denominadas antígenos en la presente memoria (por ejemplo CD3) pueden ser cualquier forma nativa de las proteínas de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo seres humanos) y roedores (por ejemplo ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. En una realización particular, el antígeno es una proteína humana. En el caso de que se haga referencia a una proteína específica en la presente memoria, la expresión comprende la proteína no procesada “de longitud completa”, así como cualquier forma de la proteína que resulte del procesamiento en la célula. La expresión comprende además variantes naturales de la proteína, por ejemplo variantes de procesamiento o variantes alélicas. Una proteína humana ejemplar útil como antígeno es CD3, particularmente la subunidad epsilon de CD3 (ver UniProt nº P07766 (versión 130), NCBI RefSeq nº NP_000724.1, SEC ID nº 1 para la secuencia humana, o Uniprot nº Q95LI5 (versión 49), NCBI GenBank nº BAB71849.1, SEC ID nº 2 para la secuencia de *Cynomolgus* [*Macaca fascicularis*]) o el antígeno carcinoembrionario (ACE), también conocido como la molécula 5 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (ACECAM5, UniProt nº P06731 (versión 119), NCBI RefSeq nº NP_004354.2). En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a

antígeno activadora de células T de la invención se une a un epítipo de CD3 o a ACE que se encuentra conservada entre los antígenos CD3 o ACE de diferentes especies.

La expresión “unión específica” se refiere a que la unión es selectiva para el antígeno y puede discriminarse de interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de la fracción de unión a antígeno de unirse a un determinante antigénico específico puede medirse mediante un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) u otra técnica que resulte familiar al experto en la materia, por ejemplo la técnica de resonancia del plasmón superficial (analizada en un sistema BIACORE T100) (Liljeblad et al., Glyco. J. 17:323-329, 2000) y ensayos de unión tradicionales (Heeley R.P., Endocr. Res. 28:217-229, 2002). En una realización, el grado de unión de una fracción de unión a antígeno a una proteína no relacionada es inferior a aproximadamente 10% de la unión de la fracción de unión a antígeno al antígeno medida, por ejemplo, mediante RPS. En determinadas realizaciones, una fracción de unión a antígeno que se une al antígeno o una molécula de unión a antígeno que comprende la fracción de unión a antígeno presenta una constante de disociación (K_D) $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo de 10^{-8} M o inferior, por ejemplo de entre 10^{-8} M y 10^{-13} M , por ejemplo de entre 10^{-9} M y 10^{-13} M).

El término “afinidad” se refiere a la magnitud de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo un receptor) y su pareja de unión (por ejemplo un ligando). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo una fracción de unión a antígeno y un antígeno, o un receptor y su ligando). La afinidad de una molécula X para su pareja Y puede representarse de manera general con la constante de disociación (K_D), que es la proporción entre las constantes de tasa de disociación y de asociación (k_{off} y k_{on} , respectivamente). De esta manera, afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de tasa, con la condición de que la proporción entre las constantes de tasa siga igual. La afinidad puede medirse mediante métodos bien establecidos y conocidos de la técnica, incluyendo los indicados en la presente memoria. Un método particular para medir la afinidad es la resonancia del plasmón superficial (RPS).

La expresión “unión reducida”, por ejemplo la unión reducida a un receptor de Fc, se refiere a una reducción de la afinidad para la interacción respectiva, medida mediante, por ejemplo, RPS. Para mayor claridad, la expresión incluye también la reducción de la afinidad a cero (o a menos del límite de detección del método analítico), es decir, la

anulación completa de la interacción. A la inversa, "unión incrementada" se refiere a un incremento de la afinidad de unión para la interacción respectiva.

Un "antígeno de células T activador" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un determinante antigénico expresado sobre la superficie de un linfocito T, particularmente un linfocito T citotóxico, que es capaz de inducir la activación de las células T tras la interacción con una molécula de unión a antígeno. Concretamente, la interacción de una molécula de unión a antígeno con un antígeno de células T activador puede inducir la activación de las células T mediante la inducción de la cascada de señalización del complejo de receptor de células T. En una realización particular, el antígeno de células T activador es CD3, particularmente la subunidad epsilon de CD3 (ver UniProt nº P07766 (versión 130), NCBI RefSeq nº NP_000724.1, SEC ID nº 1 para la secuencia humana, o Uniprot nº Q95LI5 (versión 49), NCBI GenBank nº BAB71849.1, SEC ID nº 2 para la secuencia de *Cynomolgus [Macaca fascicularis]*).

La expresión "activación de las células T" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una o más respuestas celulares de un linfocito T, particularmente un linfocito T citotóxico, seleccionadas de entre: proliferación, diferenciación, secreción de citoquinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención son capaces de inducir la activación de las células T. Los ensayos adecuados para medir la activación de las células T son conocidos de la técnica descrita en la presente memoria.

Un "antígeno de célula diana" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un determinante antigénico presentado sobre la superficie de una célula diana, por ejemplo una célula en un tumor, tal como una célula de cáncer o una célula del estroma tumoral. En una realización particular, el antígeno de célula diana es ACE, particularmente el ACE humana.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "primer", "segundo" o "tercer" con respecto a las moléculas de Fab, etc., se utilizan por conveniencia para distinguir en qué casos se encuentra presente más de uno de cada tipo de fracción. La utilización de dichas expresiones no pretende proporcionar un orden u orientación específico de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de las células T a menos que ello se indique explícitamente.

Una "molécula de Fab" se refiere a una proteína que consiste de los dominios VH y CH1 de la cadena pesada (la "cadena pesada de Fab") y los dominios VL y CL de la cadena ligera (la "cadena ligera de Fab") de una inmunoglobulina.

El término "fusionado" se refiere a que los componentes (por ejemplo una molécula de Fab y una subunidad de dominio Fc) se encuentran unidos mediante enlaces peptídicos, directamente o mediante uno o más conectores peptídicos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "de una cadena" se refiere a una molécula que comprende monómeros aminoácidos conectados linealmente mediante enlaces peptídicos. En determinadas realizaciones, una de las fracciones de unión a antígeno es una molécula de Fab de cadena sencilla, es decir, una molécula de Fab en la que la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se conectan mediante un conector peptídico formando una única cadena peptídica. En una realización particular de entre dichas realizaciones, el extremo C-terminal de la cadena ligera de Fab se conecta con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab en la molécula de Fab de cadena sencilla. Una molécula de Fab "entrecruzada" (también denominada "Crossfab") se refiere a una molécula de Fab en la que los dominios variables o los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera de Fab se encuentran intercambiadas (es decir, sustituidas una por otra), es decir la molécula de Fab entrecruzada comprende una cadena peptídica compuesta del dominio variable de cadena ligera VL y el dominio constante de cadena pesada 1 CH1 (VL-CH1, en dirección N- a C-terminal) y una cadena peptídica compuesta del dominio variable de cadena pesada VH y el dominio constante de cadena ligera CL (VH-CL, en dirección N- a C-terminal). Para mayor claridad, en una molécula de Fab entrecruzada en la que los dominios variables de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se encuentran intercambiados, comprendiendo la cadena peptídica el dominio constante de cadena pesada 1 CH1, denominada en la presente memoria "cadena pesada" de la molécula de Fab (entrecruzada). A la inversa, en una molécula de Fab entrecruzada en la que los dominios constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se encuentran intercambiados, comprendiendo la cadena peptídica el dominio variable de cadena VH, denominada en la presente memoria "cadena pesada" de la molécula de Fab (entrecruzada).

En contraste con lo anterior, una molécula de Fab "convencional" se refiere a una molécula de Fab en su formato natural, es decir, que comprende una cadena pesada compuesta de los dominios variable y constante de la cadena pesada (VH-CH1, en dirección N- a C-terminal) y una cadena ligera compuesta de los dominios variable y constante de la cadena ligera (VL-CL, en dirección N- a C-terminal).

La expresión "molécula de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que presenta la estructura de un anticuerpo de origen natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase IgG son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que se encuentran unidas mediante enlaces disulfuro. De extremo N-terminal a extremo C-terminal, cada cadena pesada presenta una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o una región variable de cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también denominado región constante de cadena pesada. De manera similar, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, cada cadena ligera presenta una región variable (VL), también denominada dominio ligero variable o dominio variable de cadena ligera, seguido de un dominio ligero constante (CL), también denominado región constante de cadena ligera. La cadena pesada de una inmunoglobulina puede asignarse a cinco tipos, denominados α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), algunos de los cuales puede dividirse adicionalmente en subtipos, por ejemplo γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) y α_2 (IgA₂). La cadena ligera de una inmunoglobulina puede asignarse a uno de entre dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina consiste esencialmente de dos moléculas de Fab y un dominio Fc, unidos mediante la región bisagra de inmunoglobulina.

El término "anticuerpo" en la presente memoria se utiliza en el sentido más amplio y comprende diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpo, con la condición de que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula diferente de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo scFv) y anticuerpos de dominio único. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, ver Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003. Para una revisión de los fragmentos scFv, ver, por ejemplo, Plückthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore (editores), Springer-Verlag, New York, páginas 269 a 315, 1994; ver también el documento nº WO 93/16185, y las patentes US nº 5.571.894 y nº 5.587.458. Para un comentario de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítipo ligante de receptor de reciclaje y que presentan una vida media incrementada, ver la patente US nº 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a

antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Ver, por ejemplo, la patente nº EP 404.097, el documento nº WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003, y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993. Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003. Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de único dominio es un anticuerpo de único dominio humano (Domantis Inc., Waltham M.A.; ver, por ejemplo, la patente US nº 6.248.516 B1). Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, aunque sin limitación, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por parte de células huésped recombinantes (por ejemplo *E. coli* o fagos), tal como se describe en la presente memoria.

La expresión "dominio de unión a antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente y es complementaria a parte o la totalidad de un antígeno. Puede proporcionarse un dominio de unión a antígeno mediante, por ejemplo, uno o más dominios variables de anticuerpo (también denominados regiones variables de anticuerpo). Particularmente, el dominio de unión a antígeno comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente presentan estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco (FRs) conservadas y tres regiones hipervariables (RHV) Ver, por ejemplo, Kindt et al., Kuby Immunology, 6a ed., W.H. Freeman and Co., página 91, 2007. Puede resultar suficiente un único dominio VH o VL para proporcionar especificidad de unión de antígeno.

La expresión "región hipervariable", o "RHV", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). Generalmente, los anticuerpos de cuatro cadenas nativos comprenden seis RHV, tres en la VH (H1, H2 y H3) y tres en la VL (L1, L2 y L3). Las RHV generalmente comprenden residuos aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de complementariedad" (RDC), presentando éstas últimas una

variabilidad de secuencia más alta y/o participando en el reconocimiento de antígeno. Con la excepción de la RDC1 en VH, las RDC generalmente comprenden los residuos aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las regiones hipervariables (RHV) también se denominan "regiones determinantes de complementariedad" (RDC) y estas expresiones se utilizan intercambiamente en la presente memoria en referencia a partes de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región particular ha sido descrita por Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, y por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987, en las que las definiciones incluyen residuos aminoácidos solapantes o subconjuntos de residuos aminoácidos al compararlas entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes de la misma pretende encontrarse comprendida dentro del alcance de la expresión según se define y se utiliza en la presente memoria. Los residuos aminoácidos apropiados que comprenden las RDC tal como se definen en cada una de las referencias citadas se proporcionan a continuación, en la Tabla A, a modo comparativo. El número exacto de residuos que comprende una CDR particular varía dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. El experto en la materia podrá determinar rutinariamente qué residuos comprende una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo. Las secuencias de RDC proporcionadas en la presente memoria generalmente siguen la definición de Kabat.

TABLA 1. Definiciones de RDC¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
V _H RDC1	31-35	26-32	26-35
V _H RDC2	50-65	52-58	50-58
V _H RDC3	95-102	95-102	95-102
V _L RDC1	24-34	26-32	24-34
V _L RDC2	50-56	50-52	50-56
V _L RDC3	89-97	91-96	89-97

¹La numeración de todas las definiciones de RDC en la Tabla A sigue las convenciones de numeración proporcionadas por Kabat et al. (ver posteriormente).

² “AbM” con una “b” minúscula, tal como se utiliza en la Tabla A, se refiere a las CDR según la definición del programa informático de modelado de anticuerpos “AbM” de Oxford Molecular.

Kabat et al. también han definido un sistema de numeración para las secuencias de dominio variable que resulta aplicable a cualquier anticuerpo. El experto ordinario en la materia podrá asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable sin basarse en ningún dato experimental más allá de la secuencia misma. Tal como se utiliza en la presente memoria en relación a las secuencias de región variable, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración según Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. A menos que se indique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuos aminoácidos en una región variable de anticuerpo siguen el sistema de numeración de Kabat.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las posiciones de aminoácidos de todas las regiones y dominios constantes de las cadenas pesada y ligera se numeran según el sistema de numeración de Kabat descrito en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, y se denomina "numeración según Kabat" o "numeración de Kabat" en la presente memoria. Concretamente, el sistema de numeración de Kabat (ver las páginas 647 a 660 de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) se utiliza para el dominio constante de cadena ligera CL de isotipo kappa y lambda, y el sistema de numeración de índice EU de Kabat (ver las páginas 661 a 723) se utiliza para los dominios constantes de cadena pesada (CH1, bisagra, CH2 y CH3), que se clarifica adicionalmente en la presente memoria haciendo referencia a la "numeración según el índice EU de Kabat" en este caso.

Las secuencias polipeptídicas del listado de secuencias no se numeran según el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, se encuentra perfectamente comprendido dentro de los conocimientos del experto ordinario en la materia convertir la numeración de las secuencias del listado de secuencias a la numeración de Kabat.

El término "marco" o "FR" se refiere a residuos de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable (RHV). La FR de un dominio variable generalmente consiste de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. De acuerdo con lo anterior, las secuencias de RHV y FR generalmente aparecen en la secuencia siguiente en VH (o en VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Un anticuerpo “humanizado” se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende los residuos aminoácidos de RHV no humanas y los residuos aminoácidos de FR humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las RHV (por ejemplo las CDR), corresponden a las de un anticuerpo no humano, y la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Dichos dominios variables se denominan en la presente memoria “región variable humanizada”. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender por lo menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una “forma humanizada” de un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sido sometido a humanización. Otras formas de “anticuerpos humanizados” comprendidas dentro de la presente invención son aquéllas en las que la región constante ha sido adicionalmente modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la del receptor de Fc (FcR).

La “clase” de un anticuerpo o inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante que presenta su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpo: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

La expresión “dominio Fc” o “región Fc” en la presente memoria se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene por lo menos parte de la región constante. La expresión incluye las regiones de Fc de secuencia nativa y las regiones de Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la región Fc de cadena pesada de IgG humana habitualmente se define que se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo-terminal de la cadena pesada. Sin embargo, los anticuerpos producidos por las células huésped puede experimentar un corte post-traducciona l de uno o más, particularmente de uno o dos, aminoácidos desde el extremo C-terminal de la cadena pesada. Por lo tanto, un anticuerpo producido por una célula huésped mediante la expresión de una molécula específica de ácidos nucleicos, codificante de una cadena pesada de longitud completa puede incluir la cadena pesada de longitud completa, o puede incluir una variante cortada de la cadena pesada de longitud completa (también denominada en la presente memoria “variante cortada de cadena pesada”). Éste puede

ser el caso en el que los dos aminoácidos C-terminales finales de la cadena pesada son glicina (G446) y lisina (K447, numeración según el índice EU de Kabat). Por lo tanto, la lisina C-terminal (Lys447) o la glicina (Gly446) y lisina (K447) C-terminales de la región Fc puede encontrarse presente o no. Las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas, incluyendo los dominios Fc (o una subunidad de un dominio Fc tal como se define en la presente memoria), se indican en la presente memoria sin dipéptido C-terminal de glicina-lisina, a menos que se indiquen de otra manera. En una realización de la invención, una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc tal como se especifica en la presente memoria, comprendida en una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención, comprende un dipéptido glicina-lisina C-terminal adicional (G446 y K447, numeración según el índice EU de Kabat). En una realización de la invención, una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc tal como se especifica en la presente memoria, comprendida en una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención, comprende un residuo de glicina C-terminal adicional (G446, numeración según el índice EU de Kabat). Las composiciones de la invención, tales como las composiciones farmacéuticas indicadas en la presente memoria, comprenden una población de moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención. La población de moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T puede comprender una cadena pesada de longitud completa y moléculas que presentan una variante cortada de cadena pesada. La población de moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T puede consistir de una mezcla de moléculas que presentan una cadena pesada de longitud completa y moléculas que presentan una variante cortada de cadena pesada, en la que por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T presentan una variante cortada de cadena pesada. En una realización de la invención, una composición que comprende una población de moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T comprende una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc tal como se especifica en la presente memoria con un dipéptido glicina-lisina C-terminal adicional (G446 y K447, numeración según el índice EU de Kabat). En una realización de la invención, una composición que comprende una población de moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T comprende una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc tal como se especifica en la presente memoria con un residuo de glicina C-terminal adicional (G446, numeración según el índice EU de Kabat). En una realización de la invención, dicha composición comprende una población de moléculas biespecíficas de unión a antígeno

activadoras de células T que comprende moléculas que comprenden una cadena pesada, incluyendo un dominio Fc tal como se especifica en la presente memoria; moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc tal como se especifica en la presente memoria con un residuo de glicina C-terminal adicional (G446, numeración según el índice EU de Kabat) y moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc tal como se especifica en la presente memoria, con un dipéptido glicina-lisina C-terminal adicional (G446 y K447, numeración según el índice EU de Kabat). A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, la numeración de los residuos aminoácidos en la región Fc o en la región constante se lleva a cabo según el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, tal como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 (ver también anteriormente). Una "subunidad" de un dominio Fc tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc dímérico, es decir, un polipéptido que comprende las regiones constantes C-terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, capaces de autoasociación estable. Por ejemplo, una subunidad de un dominio Fc de IgG comprende un dominio constante CH2 de IgG y un dominio constante CH3 de IgG.

Una "modificación que estimula la asociación de la primera y la segunda subunidades del dominio Fc" es una manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones post-traduccionales de una subunidad de dominio Fc que reduce o impide la asociación de un polipéptido que comprende la subunidad de dominio Fc con un polipéptido idéntico para formar un homodímero. Una modificación estimuladora de asociación tal como se utiliza en la presente memoria tal como se utiliza en la presente memoria incluye modificaciones separadas realizadas en cada una de las dos subunidades de dominio Fc que se desea que se asocien (es decir, la primera y la segunda subunidades del dominio Fc), en la que las modificaciones son complementarias entre sí de manera que estimulen la asociación de las dos subunidades de dominio Fc. Por ejemplo, una modificación estimuladora de asociación puede alterar la estructura o la carga de una o ambas subunidades de dominio Fc de manera que la asociación resulte estérica o electrostáticamente favorable, respectivamente. De esta manera, la (hetero)dimerización se produce entre un polipéptido que comprende la primera subunidad de dominio Fc y un polipéptido que comprende la segunda subunidad de dominio Fc, que podría ser no idéntica en el sentido de que los componentes adicionales fusionados con cada una de las subunidades (por ejemplo fracciones de unión a antígeno) no son iguales. En algunas realizaciones, la modificación estimuladora de asociación comprende una mutación de aminoácido en el dominio Fc, concretamente una sustitución de aminoácido. En una realización particular, la asociación

estimuladora de asociación comprende una mutación de aminoácido separada, concretamente una sustitución de aminoácido, en cada una de las dos subunidades del dominio de Fc.

La expresión "funciones efectoras" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, las cuales varían con el isotipo del anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo se incluyen: unión de C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión de receptor de Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (FCDA), secreción de citoquinas, incorporación de antígenos mediada por el complejo inmunológico por parte de células presentadoras de antígenos, regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo receptores de células B) y activación de las células B.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "manipular, manipulado, manipulación" se considera que incluyen cualquier manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones post-traduccionales de un polipéptido natural o recombinante o fragmento del mismo. La manipulación incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glucosilación o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de dichos enfoques.

La expresión "mutación de aminoácido" tal como se utiliza en la presente memoria pretende comprender sustituciones, deleciones, inserciones y modificaciones de aminoácidos. Puede realizarse cualquier combinación de sustitución, delección, inserción y modificación para conseguir el constructo final, con la condición de que el constructo final presente las características deseadas, por ejemplo de unión reducida a un receptor de Fc o una asociación incrementada a otro péptido. Entre las deleciones e inserciones de secuencia de aminoácidos se incluyen las deleciones amino- y/o carboxi-terminales y las inserciones de aminoácidos. Son mutaciones de aminoácidos particulares las sustituciones de aminoácidos. Para el propósito de alterar, por ejemplo, las características de unión de una región de Fc, resultan particularmente preferentes las sustituciones de aminoácidos no conservadoras, es decir, la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que presenta diferentes propiedades estructurales y/o químicas. Entre las sustituciones de aminoácidos se incluyen la sustitución por aminoácidos naturales o por derivados aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándares (por ejemplo 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina y 5-hidroxilisina). Pueden generarse mutaciones de aminoácidos utilizando métodos genéticos o químicos bien conocidos de la técnica. Entre los métodos genéticos pueden incluirse la mutagénesis sitio-dirigida, la PCR,

la síntesis génica y similares. Se encuentra contemplado que también puedan resultar útiles métodos de alteración del grupo de cadena lateral de un aminoácido mediante métodos diferentes de la ingeniería genética, tales como la modificación química. En la presente memoria pueden utilizarse diversas denominaciones para indicar la misma mutación de aminoácido. por ejemplo, una sustitución de prolina en la posición 329 del dominio de Fc por glicina puede indicarse como 329G, G329, G₃₂₉, P329G o Pro329Gly.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) conectados linealmente mediante enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. De esta manera, dentro de la definición de "polipéptido" se incluyen péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos" o cualquier otra expresión utilizada para referirse a una cadena de dos o más aminoácidos, y el término "polipéptido" puede utilizarse en lugar de, o intercambiabilmente con cualquiera de dichas expresiones. El término "polipéptido" también pretender referirse a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, incluyendo, aunque sin limitación, la glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes, corte proteolítico o modificación con aminoácidos naturales. Puede derivarse un polipéptido de una fuente biológica natural o producirse mediante tecnología recombinante, aunque no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácidos nucleicos designada. Puede generarse de cualquier manera, incluyendo mediante síntesis química. Un polipéptido de la invención puede presentar un tamaño de aproximadamente 3 ó más, 5 ó más, 10 ó más, 20 ó más, 25 ó más, 50 ó más, 75 ó más, 100 ó más, 200 ó más, 500 ó más, 1.000 ó más, ó 2.000 ó más aminoácidos. Los polipéptidos pueden presentar una estructura tridimensional definida, aunque no presentan necesariamente dicha estructura. Se hace referencia a los polipéptidos con una estructura tridimensional definida como plegados, y a los polipéptidos que no presentan una estructura tridimensional definida, sino que pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes, como no plegados.

Un polipéptido o variante del mismo "aislado", o derivado del mismo, pretende referirse a un polipéptido que no se encuentra en su ambiente natural. No resulta necesario un nivel particular de purificación. Por ejemplo, puede extraerse un polipéptido aislado de su ambiente nativo o natural. Los polipéptidos producidos recombinantemente y las proteínas expresadas en células huésped se consideran aislados para los fines de la invención, al igual que los polipéptidos nativos o recombinantes que han sido separados, fraccionados o parcial o sustancialmente purificados mediante cualquier técnica adecuada.

La expresión “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencias.

La alineación con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede realizarse de diversas maneras que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia, por ejemplo utilizando software informático disponible públicamente, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). El experto en la materia podrá determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines de la presente memoria, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos generados utilizando el programa informático de comparación de secuencias llamado ALIGN-2. El autor del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 es Genentech, Inc., y el código fuente ha sido presentado con la documentación para usuario en el U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, en donde se encuentra registrado con el nº TXU510087 del U.S. Copyright Office. El programa ALIGN-2 se encuentra disponible públicamente de Genentech Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para la utilización en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían. En la situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos dada A que presenta o que comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula del modo siguiente:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

en la que X es el número de residuos aminoácidos puntuados como correspondencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación de este programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos aminoácidos en B. Se aprecia que, en el caso de que la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de

aminoácidos de A frente a B no es igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B frente a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en la presente memoria se obtienen tal como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

El término "polinucleótido" se refiere a una molécula o constructo aislado de ácidos nucleicos, por ejemplo ARN mensajero (ARNm), ARN de origen vírico o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo un enlace amida, tal como el presente en los ácidos péptido-nucleicos (APN)). La expresión "molécula de ácidos nucleicos" se refiere a uno o más segmentos de ácidos nucleicos cualesquiera, por ejemplo fragmentos de ADN o de ARN, presentes en un polinucleótido.

El término "aislado" referido a una molécula de ácido nucleico o polinucleótido se refiere a una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que ha sido extraída de su ambiente nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante codificante de un polipéptido contenido en un vector se considera aislado para los fines de la presente invención. Entre los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado se incluyen los polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o los polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula de polinucleótido contenida en células que habitualmente contienen la molécula de polinucleótido, aunque la molécula de polinucleótido se encuentra presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural. Entre las moléculas de ARN aisladas se incluyen los transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente invención, así como las formas de cadena positiva y negativa, y las formas de doble cadena. Entre los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados según la presente invención se incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser, o puede incluir un elemento regulador, tal como un promotor, un sitio de unión ribosómica o un terminador de transcripción.

Por un ácido nucleico o polinucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos por lo menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención se hace referencia a que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia polinucleótida puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que presente

una secuencia de nucleótidos por lo menos 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden deletarse o sustituirse por otro nucleótido, o puede insertarse en la secuencia de referencia un número de nucleótidos de hasta 5% del total de nucleótidos de la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier sitio entre dichas posiciones terminales, entre los residuos individualmente en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. En la práctica, puede determinarse convencionalmente si cualquier secuencia polinucleótida particular es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos de la presente invención utilizando programas informáticos conocidos, tales como los comentados anteriormente para los polipéptidos (por ejemplo ALIGN-2).

La expresión "casete de expresión" se refiere a un polinucleótido generado recombinantemente o sintéticamente, con una serie de elementos ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante puede incorporarse en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plástido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la parte de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácidos nucleicos que debe transcribirse y un promotor. En determinadas realizaciones, el casete de expresión de la invención comprende secuencias polinucleótidas que codifican moléculas biespecíficas de unión a antígeno de la invención o fragmentos de las mismas.

El término "vector" o "vector de expresión" es sinónima de "constructo de expresión" y se refiere a una molécula de ADN que se utiliza para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que se encuentra operablemente asociada en una célula diana. El término incluye el vector en forma de estructura de ácidos nucleicos autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que ha sido introducido. El vector de expresión de la presente invención comprende un casete de expresión. Los vectores de expresión permiten la transcripción de grandes cantidades de ARNm estable. Una vez el vector de expresión se encuentra en el interior de la célula diana, la molécula de ácido ribonucleico o la proteína que se encuentra codificada por el gen es producida por la maquinaria celular de transcripción y/o traducción. En una realización, el vector de expresión de la invención comprende un casete de expresión que comprende secuencias polinucleótidas que codifican moléculas biespecíficas de unión a antígeno de la invención o fragmentos de las mismas.

Las expresiones “célula huésped”, “línea celular huésped” y “cultivo de células huésped” se utilizan intercambiabilmente y se refieren a células en las que se han introducido ácidos nucleicos exógenos, incluyendo la progenie de dichas células. Entre las células huésped se incluyen “transformantes” y “células transformadas”, que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma con independencia del número de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica en su contenido de ácidos nucleicos a una célula parental, pero puede contener mutaciones. La progenie mutante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado o selección de entre las células originalmente transformadas se encuentra incluida en la presente memoria. Una célula huésped es cualquier tipo de sistema celular que puede utilizarse para generar las moléculas biespecíficas de unión a antígeno de la presente invención. Entre las células huésped se incluyen células en cultivo, por ejemplo células de mamífero en cultivo, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, entre otros, aunque también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido vegetal o animal en cultivo.

Un "receptor de Fc activador" es un receptor de Fc que tras la unión mediante un dominio de Fc de un anticuerpo induce sucesos de señalización que estimulan a que la célula portadora de receptor realice funciones efectoras. Entre los receptores de Fc activadores humanos se incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89). La citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) es un mecanismo inmunológico que conduce a la lisis de células diana recubiertas de anticuerpo por parte de células inmunológicas efectoras. Las células diana son células a las que se unen específicamente anticuerpos o derivados de los mismos que comprenden una región Fc, generalmente mediante la parte proteínica que es N-terminal respecto a la región Fc. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "CCDA reducida" se define como una reducción del número de células diana que son lisadas en un tiempo dado, a una concentración dada de anticuerpo en el medio circundante a las células diana, mediante el mecanismo de CCDA definido anteriormente, y/o un incremento de la concentración de anticuerpo en el medio circundante a las células diana, necesario para conseguir la lisis de un número dado de células diana en un tiempo dado, mediante el mecanismo de CCDA. La reducción de CCDA es respecto a la CCDA mediada por el mismo anticuerpo producido por el mismo tipo de células huésped, utilizando los mismos métodos estándares de producción, purificación, formulación y almacenamiento (los cuales son conocidos por el experto en la materia), pero que no ha sido generada. Por ejemplo, la reducción de la CCDA mediada por un anticuerpo que comprende en su dominio de Fc una sustitución de aminoácido que

reduce la CCDA, es respecto a la CCDA mediada por el mismo anticuerpo sin dicha sustitución de aminoácido en el dominio de Fc. Los ensayos adecuados para medir la CCDA son bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, la publicación de patente PCT nº WO 2006/082515 o la publicación de patente PCT nº WO 2012/130831).

Una "cantidad eficaz" de un agente se refiere a la cantidad necesaria para resultar en un cambio fisiológico en la célula o tejido en el que se administra.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo de una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad que resulta eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, reduce, retrasa, minimiza o impide los efectos adversos de una enfermedad.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Entre los mamíferos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, animales domesticados (por ejemplo vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo ratones y ratas). Particularmente, el individuo o sujeto es un ser humano.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma resulte eficaz, y que no contiene componentes adicionales que resulten inaceptablemente tóxicos para un sujeto en el que se administre la formulación.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, aparte de un ingrediente activo, que no resulta tóxico para el sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, aunque sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizador o conservante.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "tratando") se refieren a la intervención clínica en un intento para alterar el curso natural del individuo bajo tratamiento, y puede llevarse a cabo para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Entre los efectos deseables del tratamiento se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la prevención de la aparición o de la recurrencia de una enfermedad, el alivio de los síntomas, la reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la reducción de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico. En algunas

realizaciones, se utilizan moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para enlentecer el avance de la misma.

La expresión “impresos dentro del paquete” se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias referentes a la utilización de dichos productos terapéuticos.

Descripción detallada de las realizaciones

La invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T con propiedades favorables para la aplicación terapéutica, en particular con eficacia y seguridad mejoradas (por ejemplo con respecto a la activación no específica de las células T o la selectividad para células tumorales respecto a las células normales), y una producibilidad mejorada (por ejemplo con respecto a la pureza y el rendimiento).

Los inventores han descubierto que las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T que comprenden una fracción de unión a antígeno con especificidad de unión del anticuerpo ACE T84.66 (Wagener et al., J. Immunol. 130:2308-, 1983; Neumaier et al., J. Immunol. 135:3604, 1985) proporcionan una potencia inesperadamente elevada en la mediación de la eliminación de células tumorales expresantes de ACE por parte de las células T. Además, se ha encontrado inesperadamente que las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T que comprenden una nueva versión humanizada del anticuerpo T84.66 muestran una selectividad mejorada para las células tumorales respecto a las células normales en comparación con una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende el ligante de T84.66 parental.

Modificación de la carga

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención pueden comprender sustituciones de aminoácidos en las moléculas de Fab comprendidas en las mismas que resultan particularmente eficientes en la reducción del apareamiento incorrecto de las cadenas ligeras con cadenas pesadas no correspondientes (productos secundarios de tipo Bence-Jones), que pueden producirse en la producción de moléculas de unión a antígeno bi-/multi-específicas basadas en Fab con un intercambio VH/VL en uno (o más, en el caso de moléculas que comprenden más de dos moléculas de Fab de

unión a antígeno) de sus brazos de unión (ver también la publicación PCT nº WO2015/150447, particularmente los ejemplos en la misma, incorporada en la presente memoria como referencia en su totalidad).

De acuerdo con lo anterior, en realizaciones particulares, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención comprende:

(a) una primera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno,

(b) una segunda molécula de Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y

en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se sustituyen uno por otro,

en la que el primer antígeno es un antígeno de células T activador y el segundo antígeno es el ACE, o el primer antígeno es el ACE y el segundo antígeno es un antígeno de células T activador, y

en la que:

- i) en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 124 es sustituido por un aminoácido con carga positiva (numeración según Kabat), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 es sustituido por un aminoácido con carga negativa (numeración según el índice EU de Kabat), o
- ii) en el dominio constante CL de la segunda molécula de Fab bajo b) el aminoácido en la posición 124 es sustituido por un aminoácido con carga positiva (numeración según Kabat), y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda molécula de Fab bajo b) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 es sustituido por un aminoácido con carga negativa (numeración según el índice EU de Kabat).

La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T no comprende las dos modificaciones mencionadas en i) e ii). Los dominios constantes CL y CH1 de la segunda molécula de Fab no son sustituidas uno por otro (es decir, permanecen sin intercambio).

En una realización del a molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab bajo a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)) y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en

la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización adicional, en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización particular, en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab bajo a), el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización más particular, en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por lisina (K) o arginina (R) (numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab bajo a), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización todavía más particular, en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab bajo a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por arginina (R) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab bajo a), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).

En realizaciones particulares, el dominio constante CL de la primera molécula de Fab bajo a) es del isotipo kappa.

Alternativamente, las sustituciones de aminoácidos según las realizaciones anteriormente indicadas pueden llevarse a cabo en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la segunda molécula de Fab bajo b) en lugar de en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab bajo a). En realizaciones particulares de entre dichas realizaciones, el dominio constante CL de la segunda molécula de Fab bajo b) es del isotipo kappa.

La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención puede comprender además una tercera molécula de Fab que se une específicamente al primer antígeno. En realizaciones particulares, dicha tercera molécula de Fab es idéntica a la primera molécula de Fab bajo a). En dichas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos según las realizaciones anteriormente indicadas se realizarán en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de cada una de la primera molécula de Fab y la tercera molécula de Fab. Alternativamente, las sustituciones de aminoácidos según las realizaciones anteriormente indicadas pueden llevarse a cabo en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la segunda molécula de Fab bajo b), aunque no en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab y la tercera molécula de Fab.

En realizaciones particulares, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende además un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades capaces de asociación estable.

Formatos de molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T

Los componentes de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T pueden fusionarse entre sí en una diversidad de configuraciones. Se muestran las configuraciones ejemplares en la figura 1.

En realizaciones particulares, las fracciones de unión a antígeno comprendidas en la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T son moléculas de Fab. En dichas realizaciones, la primera, segunda, tercera, etc. fracción de unión a antígeno puede denominarse en la presente memoria primera, segunda, tercera, etc. molécula de Fab, respectivamente. Además, en realizaciones particulares, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades capaces de asociación estable.

En algunas realizaciones, la segunda molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidades del dominio Fc.

En una de dichas realizaciones, la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab. En una realización específica de entre dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T consiste esencialmente de la primera y segunda moléculas de Fab, el dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades, y opcionalmente uno o más péptidos conectores, en el que la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab, y la segunda molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidades del dominio Fc. Dicha configuración se ilustra esquemáticamente en las figuras 1G y 1K. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab pueden adicionalmente fusionarse entre sí.

En otra de dichas realizaciones, la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la primera o segunda subunidades del dominio Fc. En una realización específica de entre dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T consiste esencialmente de la primera y la segunda moléculas de Fab, el dominio Fc está compuesto de una primera y una segunda subunidades, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en el que la primera y la segunda moléculas de Fab se fusionan, cada una, con el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc. Dicha configuración se ilustra esquemáticamente en las figuras 1A y 1D. La primera y la segunda moléculas de Fab pueden fusionarse con el dominio Fc directamente o mediante un conector peptídico. En una realización particular, la primera y la segunda moléculas de Fab se fusionan, cada una, con el dominio Fc mediante una región bisagra de inmunoglobulina. En una realización específica, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, particularmente en la que el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁.

En otra realizaciones, la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la primera o segunda subunidades del dominio Fc.

En una de dichas realizaciones, la segunda molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab. En una realización específica de entre dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T consiste esencialmente de la primera y segunda moléculas de Fab, el dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades, y opcionalmente uno o más péptidos conectores, en el que la segunda molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab, y la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidades del dominio Fc. Dicha configuración se ilustra esquemáticamente en las figuras 1H y 1L. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab pueden adicionalmente fusionarse entre sí.

Las moléculas de Fab pueden fusionarse con el dominio Fc o entre sí directamente o mediante un conector peptídico, que comprende uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2 a 20 aminoácidos. Los conectores peptídicos son conocidos de la técnica y se describen en la presente memoria. Entre los conectores peptídicos no inmunogénicos adecuados se incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$. 'n' es generalmente un número entero entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4. En una realización, dicho conector peptídico presenta una longitud de por lo menos 5 aminoácidos; en una realización presenta una longitud de entre 5 y 100; en una realización adicional, de entre 10 y 50 aminoácidos. En una realización, dicho péptido conector es $(G_xS)_n$ o $(G_xS)_nG_m$, con G=glicina, S=serina y $(x=3, n=3, 4, 5$ o $6, y m=0, 1, 2$ o $3)$ o $(x=4, n=2, 3, 4$ o $5 y m=0, 1, 2$ o $3)$; en una realización, $x=4$ y $n=2$ o 3 ; en una realización adicional, $x=4$ y $n=2$. En una realización, dicho conector peptídico es $(G_4S)_2$. Un conector peptídico particularmente adecuado para fusionar las cadenas ligeras de Fab de la primera y la segunda moléculas de Fab entre sí es $(G_4S)_2$. Un conector peptídico ejemplar adecuado para conectar las cadenas pesadas de Fab del primer y segundo fragmentos de Fab comprende la secuencia $(D)-(G_4S)_2$ (SEC ID nº 11 y nº 12). Otro conector adecuado comprende la secuencia $(G_4S)_4$. Además, los conectores pueden comprender (una parte de) una región bisagra de inmunoglobulina. En particular, en el caso de que una molécula de Fab se fusione con el extremo N-terminal de una subunidad de dominio Fc, puede fusionarse mediante una región bisagra de inmunoglobulina o una parte de la misma, con o sin un conector peptídico adicional.

Una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T con una única fracción de unión a antígeno (tal como una molécula de Fab) capaz de unión específica a un antígeno de la célula diana (por ejemplo tal como se muestra en la figura 1A, D, G, H, K y L) resulta útil, particularmente en casos en que cabe prever la internalización del antígeno de la célula diana tras la unión de una fracción de unión a antígeno de alta afinidad. En dichos casos, la presencia de más de una fracción de unión a antígeno específica para el antígeno de la célula diana puede incrementar la internalización del antígeno de la célula diana, reduciendo de esta manera su disponibilidad.

Sin embargo, en muchos otros casos resultará ventajoso disponer de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprenda dos o más fracciones de unión a antígeno (tales como moléculas de Fab) específicas para un antígeno de la célula diana (ver los ejemplos mostrados en la figura 1B, 1C, 1E, 1F, 1I, 1J, 1M o 1N), por ejemplo para optimizar el reconocimiento del sitio diana o para permitir el entrecruzamiento de los antígenos de la célula diana.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en realizaciones particulares, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención comprende además una tercera molécula de Fab que se une específicamente al primer antígeno. El primer antígeno preferentemente es el antígeno de la célula diana, es decir, ACE. En una realización, la tercera molécula de Fab es una molécula de Fab convencional. En una realización, la tercera molécula de Fab es idéntica a la primera molécula de Fab (es decir, la primera y la tercera moléculas de Fab comprenden las mismas secuencias de aminoácidos de cadenas pesada y ligera y la misma disposición de los dominios (es decir, convencionales o entrecruzadas)). En una realización particular, la segunda molécula de Fab se une específicamente a un antígeno de células T activador, particularmente CD3, y la primera y tercera moléculas de Fab se unen específicamente a ACE.

En realizaciones alternativas, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención comprende además una tercera molécula de Fab que se une específicamente al segundo antígeno. En una de dichas realizaciones, el segundo antígeno preferentemente es el antígeno de la célula diana, es decir ACE. En una de dichas realizaciones, la tercera molécula de Fab es una molécula de Fab entrecruzada (una molécula de Fab en la que los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesadas y ligeras de Fab se encuentran intercambiadas/sustituidas una por otra). En una de dichas realizaciones, la tercera molécula de Fab es idéntica a la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda y la tercera moléculas de Fab comprenden las mismas secuencias de aminoácidos de

cadenas pesada y ligera y la misma disposición de los dominios (es decir, convencionales o entrecruzadas)). En una de dichas realizaciones, la primera molécula de Fab se une específicamente a un antígeno de células T activador, particularmente CD3, y la segunda y tercera moléculas de Fab se unen específicamente a ACE.

En una realización, la tercera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la primera o segunda subunidades del dominio Fc.

En una realización particular, la segunda y tercera moléculas de Fab se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc y la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab. En una realización específica de entre dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T consiste esencialmente de la primera, la segunda y la tercera moléculas de Fab, el dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades, y opcionalmente uno o más péptidos conectores, en el que la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab, y la segunda molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc, y en la que la tercera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la segunda subunidad del dominio Fc. Dicha configuración se ilustra esquemáticamente en las figuras 1B y 1E (realizaciones particulares en las que la tercera molécula de Fab es una molécula de Fab convencional y preferentemente idéntica a la primera molécula de Fab) y las figuras 1I y 1M (realizaciones alternativas, en las que la tercera molécula de Fab es una molécula de Fab entrecruzada y preferentemente idéntica a la segunda molécula de Fab).

La segunda y la tercera moléculas de Fab pueden fusionarse con el dominio Fc directamente o mediante un conector peptídico. En una realización particular, la segunda y la tercera moléculas de Fab se fusionan, cada una, con el dominio Fc mediante una región bisagra de inmunoglobulina. En una realización específica, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, particularmente en la que el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab pueden adicionalmente fusionarse entre sí.

En otra realización, la primera y la tercera moléculas de Fab se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc y la segunda molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab. En una realización específica de entre dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T consiste esencialmente de la primera, la segunda y la tercera moléculas de Fab, el dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades, y opcionalmente uno o más péptidos conectores, en el que la segunda molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab, y la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc, y en la que la tercera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la segunda subunidad del dominio Fc. Dicha configuración se ilustra esquemáticamente en las figuras 1C y 1F (realizaciones particulares en las que la tercera molécula de Fab es una molécula de Fab convencional y preferentemente idéntica a la primera molécula de Fab) y las figuras 1J y 1N (realizaciones alternativas, en las que la tercera molécula de Fab es una molécula de Fab entrecruzada y preferentemente idéntica a la segunda molécula de Fab).

La primera y la tercera moléculas de Fab pueden fusionarse con el dominio Fc directamente o mediante un conector peptídico. En una realización particular, la primera y la tercera moléculas de Fab se fusionan, cada una, con el dominio Fc mediante una región bisagra de inmunoglobulina. En una realización específica, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, particularmente en la que el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab pueden adicionalmente fusionarse entre sí.

En configuraciones de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T en las que una molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de cada una de las subunidades del dominio Fc mediante una región bisagra de inmunoglobulina, las dos moléculas de Fab, las regiones bisagra y el dominio Fc forman esencialmente una molécula de inmunoglobulina. En una realización particular, la molécula de inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la clase IgG. En una realización todavía más particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG₁. En otra realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG₄. En una realización particular adicional, la inmunoglobulina es una

inmunoglobulina humana. En otras realizaciones, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina humanizada.

En algunas de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención, la cadena ligera de la primera molécula de Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab se fusionan entre sí, opcionalmente mediante un conector peptídico. Dependiendo de la configuración de la primera y la segunda moléculas de Fab, la cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab puede fusionarse en su extremo C-terminal con el extremo N-terminal de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab, o la cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab puede fusionarse en su extremo C-terminal con el extremo N-terminal de la cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab. La fusión de las cadenas ligeras de Fab de la primera y la segunda moléculas de Fab reduce adicionalmente el apareamiento incorrecto de las cadenas pesada y ligera de Fab no correspondientes y también reduce el número de plásmidos necesario para la expresión de algunas de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención.

En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena pesada es sustituida por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con una subunidad de dominio Fc ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$), y un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con una subunidad de dominio Fc ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido cadena ligera de la primera molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En determinadas realizaciones, los polipéptidos se unen covalentemente, por ejemplo mediante un enlace disulfuro.

En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico

carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena pesada es sustituida por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con una subunidad de dominio Fc ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$), y un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con una subunidad de dominio Fc ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$) y el polipéptido cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En determinadas realizaciones, los polipéptidos se unen covalentemente, por ejemplo mediante un enlace disulfuro.

En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena pesada se sustituye por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con una subunidad del dominio Fc ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$). En otras realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena pesada se sustituye por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$).

En algunas de dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido cadena ligera de Fab entrecruzado de la segunda molécula de Fab, en la que la región variable de cadena

pesada de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En otras realizaciones de entre dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con el polipéptido cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VL_{(1)}-CL_{(1)}$), o un polipéptido en el que el polipéptido cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab que, a su vez, comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}$), según resulte apropiado.

La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según dichas realizaciones puede comprender además (i) un polipéptido de subunidad de dominio Fc ($CH2-CH3(-CH4)$), o (ii) un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de una tercera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con una subunidad de dominio Fc ($VH_{(3)}-CH1_{(3)}-CH2-CH3(-CH4)$) y el polipéptido cadena ligera de Fab de una tercera molécula de Fab ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$). En determinadas realizaciones, los polipéptidos se unen covalentemente, por ejemplo mediante un enlace disulfuro.

En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región constante de cadena pesada se sustituye por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(2)}-CL_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$). En otras realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región constante de cadena pesada se sustituye por una

región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$).

En algunas de dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido cadena ligera de Fab entrecruzado de la segunda molécula de Fab, en la que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$) y el polipéptido cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$).

En otras realizaciones de entre dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con el polipéptido cadena ligera de Fab de la primera molécula de ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VL_{(1)}-CL_{(1)}$), o un polipéptido en el que el polipéptido cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab que, a su vez, comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}$), según resulte apropiado.

La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según dichas realizaciones puede comprender además (i) un polipéptido de subunidad de dominio Fc ($CH2-CH3(-CH4)$), o (ii) un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de una tercera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con una subunidad de dominio Fc ($VH_{(3)}-CH1_{(3)}-CH2-CH3(-CH4)$) y el polipéptido cadena ligera de Fab de una tercera molécula de Fab ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$). En determinadas realizaciones, los polipéptidos se unen covalentemente, por ejemplo mediante un enlace disulfuro.

En algunas realizaciones, la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab. En algunas realizaciones determinadas de dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T no comprende un dominio Fc. En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T consiste esencialmente de la primera y la segunda moléculas de Fab y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en el que la primera molécula de Fab se fusiona con el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-

terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab. Dicha configuración se ilustra esquemáticamente en las figuras 1O y 1S.

En otras realizaciones, la segunda molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab. En algunas realizaciones determinadas de dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T no comprende un dominio Fc. En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T consiste esencialmente de la primera y la segunda moléculas de Fab y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en el que la segunda molécula de Fab se fusiona con el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab. Dicha configuración se ilustra esquemáticamente en las figuras 1P y 1T.

En algunas realizaciones, la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab y la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además una tercera molécula de Fab, en la que dicha tercera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab. En realizaciones particulares de entre dichas realizaciones, dicha tercera molécula de Fab es una molécula de Fab convencional. En otras de entre dichas realizaciones, dicha tercera molécula de Fab es una molécula de Fab entrecruzada tal como se indica en la presente memoria, es decir, una molécula de Fab en la que los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesadas y ligeras de Fab se encuentran intercambiadas/sustituidas una por otra. En determinadas realizaciones de entre dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T consiste esencialmente de la primera, segunda y tercera moléculas de Fab, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en el que la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab, y la tercera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab. Dicha configuración se ilustra esquemáticamente en las figuras 1Q y 1U (realizaciones particulares en las que la tercera molécula de Fab es una molécula de Fab convencional y preferentemente idéntica a la primera molécula de Fab).

En algunas realizaciones, la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab y la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además una tercera molécula de Fab, en la que dicha tercera molécula de Fab se fusiona en el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab. En otra particular de entre dichas realizaciones, dicha tercera molécula de Fab es una molécula de Fab entrecruzada tal como se indica en la presente memoria, es decir, una molécula de Fab en la que los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesadas y ligeras de Fab se encuentran intercambiadas/sustituidas una por otra. En otras de entre dichas realizaciones, dicha tercera molécula de Fab es una molécula de Fab convencional. En determinadas realizaciones de entre dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T consiste esencialmente de la primera, segunda y tercera moléculas de Fab, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en el que la primera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab, y la tercera molécula de Fab se fusiona en el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab. Dicha configuración se ilustra esquemáticamente en las figuras 1W y 1Y (realizaciones particulares en las que la tercera molécula de Fab es una molécula de Fab entrecruzada y preferentemente idéntica a la segunda molécula de Fab).

En algunas realizaciones, la segunda molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab y la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además una tercera molécula de Fab, en la que dicha tercera molécula de Fab se fusiona en el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab. En realizaciones particulares de entre dichas realizaciones, dicha tercera molécula de Fab es una molécula de Fab convencional. En otras de entre dichas realizaciones, dicha tercera molécula de Fab es una molécula de Fab entrecruzada tal como se indica en la presente memoria, es decir, una molécula de Fab en la que los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL de las cadenas pesadas y ligeras de Fab se encuentran intercambiadas/sustituidas una por otra. En determinadas realizaciones de entre dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T consiste esencialmente de la primera, segunda y tercera moléculas de Fab, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en el que la segunda molécula de Fab se

fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab, y la tercera molécula de Fab se fusiona en el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab. Dicha configuración se ilustra esquemáticamente en las figuras 1R y 1V (realizaciones particulares en las que la tercera molécula de Fab es una molécula de Fab convencional y preferentemente idéntica a la primera molécula de Fab).

En algunas realizaciones, la segunda molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab y la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además una tercera molécula de Fab, en la que dicha tercera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab. En otra particular de entre dichas realizaciones, dicha tercera molécula de Fab es una molécula de Fab entrecruzada tal como se indica en la presente memoria, es decir, una molécula de Fab en la que los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesadas y ligeras de Fab se encuentran intercambiadas/sustituidas una por otra. En otras de entre dichas realizaciones, dicha tercera molécula de Fab es una molécula de Fab convencional. En determinadas realizaciones de entre dichas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T consiste esencialmente de la primera, segunda y tercera moléculas de Fab, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en el que la segunda molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab, y la tercera molécula de Fab se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab. Dicha configuración se ilustra esquemáticamente en las figuras 1X y 1Z (realizaciones particulares en las que la tercera molécula de Fab es una molécula de Fab entrecruzada y preferentemente idéntica a la primera molécula de Fab).

En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable

de cadena pesada se sustituye por una región variable de cadena ligera) ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido cadena ligera de la primera molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$).

En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena pesada se sustituye por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido cadena ligera de la primera molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$).

En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región constante de cadena pesada se sustituye por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$) y el polipéptido cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$).

En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab

de una tercera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena pesada se sustituye por una región variable de cadena ligera) (VH₍₃₎-CH1₍₃₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido cadena ligera de la primera molécula de Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además el polipéptido de cadena ligera de Fab de una tercera molécula de Fab (VL₍₃₎-CL₍₃₎).

En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de una tercera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región constante de cadena pesada se sustituye por una región constante de cadena ligera) (VH₍₃₎-CH1₍₃₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab (VL₍₂₎-CH1₍₂₎) y el polipéptido cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además el polipéptido de cadena ligera de Fab de una tercera molécula de Fab (VL₍₃₎-CL₍₃₎).

En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda

molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena pesada se sustituye por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la cadena pesada de Fab de una tercera molécula de Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(3)}-CH1_{(3)}$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido cadena ligera de la primera molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además el polipéptido de cadena ligera de Fab de una tercera molécula de Fab ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$).

En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región constante de cadena pesada se sustituye por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la cadena pesada de Fab de una tercera molécula de Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(3)}-CH1_{(3)}$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$) y el polipéptido cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además el polipéptido de cadena ligera de Fab de una tercera molécula de Fab ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$).

En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena

pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena pesada se sustituye por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región variable de cadena ligera de FAb de una tercera molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de una tercera molécula de Fab (es decir, la tercera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena pesada se sustituye por una región variable de cadena ligera) ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VL_{(3)}-CH1_{(3)}$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido cadena ligera de la primera molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la tercera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la tercera molécula de Fab ($VH_{(3)}-CL_{(3)}$).

En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región constante de cadena pesada se sustituye por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de una tercera molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de una tercera molécula de Fab (es decir, la tercera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región constante de cadena pesada se sustituye por una región constante de cadena ligera) ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}-VH_{(3)}-CL_{(3)}$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$) y el polipéptido cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región

variable de cadena ligera de Fab de la tercera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la tercera molécula de Fab (VL₍₃₎-CH1₍₃₎).

En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de una tercera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de una tercera molécula de Fab (/es decir, la tercera molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena pesada se sustituye por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que, en la que la región variable de cadena pesada se sustituye por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab (VL₍₃₎-CH1₍₃₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido cadena ligera de la primera molécula de Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de la tercera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la tercera molécula de Fab (VH₍₃₎-CL₍₃₎).

En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de cadena pesada de Fab de una tercera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de una tercera molécula de Fab (es decir, la tercera molécula de Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región constante de cadena pesada se sustituye por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab (es decir, la segunda molécula de Fab

comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que, en la que la región constante de cadena pesada se sustituye por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula de Fab ($VH_{(3)}-CL_{(3)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula de Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$) y el polipéptido cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En algunas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende además un polipéptido en el que la región variable de cadena ligera de Fab de la tercera molécula de Fab comparte un enlace peptídico carboxi-terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la tercera molécula de Fab ($VL_{(3)}-CH1_{(3)}$).

Según cualquiera de las realizaciones anteriores, algunos componentes de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T (por ejemplo moléculas de Fab, dominio Fc) puede fusionarse directamente o mediante diversos conectores, particularmente conectores peptídicos que comprenden uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2 a 20 aminoácidos, que se describen en la presente memoria o que son conocidos de la técnica. Entre los conectores peptídicos no inmunogénicos adecuados se incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, en los que n es generalmente un número entero entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4.

Dominio Fc

El dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T consiste de una pareja de cadenas polipeptídicas que comprenden dominios de cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es un dímero, cada subunidad del cual comprende los dominios constantes de cadena pesada de IgG CH2 y CH3. Las dos subunidades del dominio Fc son capaces de asociación estable entre sí. En una realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención comprende no más de un dominio Fc.

En una realización según la invención, el dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T es un dominio Fc de IgG. En una realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En otra realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄. En una realización más específica, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄ que comprende la sustitución de aminoácidos S228P (numeración de Kabat),

particularmente la sustitución de aminoácidos S228P. Dicha sustitución de aminoácidos reduce in vivo el intercambio de brazos de Fab de los anticuerpos IgG₄ (ver Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38:84-91, 2010). En una realización particular adicional, el dominio Fc es humano. Una secuencia ejemplar de una región Fc de IgG₁ humana se proporciona en SEC ID nº 13.

Modificaciones del dominio Fc inductoras de heterodimerización

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T según la invención comprenden diferentes moléculas de Fab, fusionadas a una u otra de entre las dos subunidades del dominio Fc; de esta manera, las dos subunidades del dominio Fc se encuentran típicamente comprendidas en dos cadenas polipeptídicas no idénticas. La coexpresión recombinante de dichos polipéptidos y la posterior dimerización conduce a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T en la producción recombinante, de esta manera resultará ventajoso introducir en el dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T una modificación estimuladora de la asociación de los polipéptidos deseados.

De acuerdo con lo anterior, en realizaciones particulares el dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención comprende una modificación estimuladora de la asociación de la primera y la segunda subunidades del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más extensiva entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana se encuentra en el dominio CH3 del dominio Fc. De esta manera, en una realización dicha modificación se encuentra en el dominio CH3 del dominio Fc.

Existen varios enfoques para las modificaciones en el dominio CH3 del dominio Fc para forzar la heterodimerización, los cuales han sido bien descritos en, por ejemplo, los documentos nº WO 96/27011, nº WO 98/050431, nº EP 1870459, nº WO 2007/110205, nº WO 2007/147901, nº WO 2009/089004, nº WO 2010/129304, nº WO 2011/90754, nº WO 2011/143545, nº WO 2012058768, nº WO 2013157954 y nº WO 2013096291.

Típicamente en la totalidad de dichos enfoques, se manipula de manera complementaria tanto el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc como el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, de manera que cada dominio CH3 (o la cadena pesada que lo comprende) ya no puede homodimerizarse con sí mismo sino que se vea forzado a heterodimerizarse con otro dominio CH3 manipulado complementario (de manera que el primer y segundo dominios CH3 heterodimerizan y no se forma ningún homodímero entre los dos primeros o los dos segundos dominios CH3). Estos diferentes

enfoques de heterodimerización mejorada de cadenas pesadas se encuentran contemplados como alternativas diferentes en combinación con las modificaciones de cadena pesada-ligera (intercambio/sustitución de VH y VL en un brazo de unión y la introducción de sustituciones de aminoácidos cargados con cargas opuestas en la interfaz CH1/CL) en la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención que reducen el apareamiento incorrecto de cadenas ligeras y los productos secundarios de tipo Bence-Jones.

En una realización específica, dicha modificación estimuladora de la asociación entre la primera y la segunda subunidades del dominio Fc es una denominada modificación "de botón en ojal", que comprende una modificación "de botón" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación "de ojal" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc.

La tecnología de botones-en-ojales se describe en, por ejemplo, las patentes US nº 5.731.168 y nº 7.695.936; Ridgway et al., Prot. Eng. 9:617-621, 1996, y Carter, J. Immunol. Meth. 248:7-15, 2001. Generalmente, el método implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfaz de un primer polipéptido y una cavidad correspondiente ("ojal") en la interfaz de un segundo polipéptido, de manera que la protuberancia puede posicionarse en la cavidad de manera que estimule la formación de heterodímeros y dificulte la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen sustituyendo cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes (por ejemplo tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfaz del segundo polipéptido mediante la sustitución de las cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina).

De acuerdo con lo anterior, en una realización particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral mayor, generando de esta manera una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que es posicionable en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral menor, generando de esta manera una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la que puede posicionarse la protuberancia del dominio CH3 de la primera subunidad.

Preferentemente, dicho residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más grande se selecciona de entre el grupo que consiste de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

Preferentemente, dicho residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona de entre el grupo que consiste de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

La protuberancia y la cavidad pueden generarse alterando el ácido nucleico codificante de los polipéptidos, por ejemplo mediante mutagénesis específica de sitio, o mediante síntesis peptídica.

En una realización específica, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc (la subunidad "de botón"), el residuo de treonina en la posición 366 se sustituye por un residuo de triptófano (T366W) y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (la subunidad "de ojal"), el residuo de tirosina en la posición 407 se sustituye por un residuo de valina (Y407V). En una realización, en la segunda subunidad del dominio Fc adicionalmente se sustituye el residuo de treonina en la posición 366 por un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se sustituye por un residuo de alanina (L368A) (numeraciones según el índice EU de Kabat).

En una realización todavía adicional, en la primera subunidad del dominio Fc adicionalmente el residuo de serina en la posición 354 se sustituye por un residuo de cisteína (S354C) o el residuo de ácido glutámico en la posición 356 se sustituye por un residuo de cisteína (E356C) y en la segunda subunidad del dominio Fc adicionalmente el residuo de tirosina en la posición 349 se sustituye por un residuo de cisteína (Y349C) (numeraciones según el índice EU de Kabat). La introducción de estos dos residuos de cisteína resulta en la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc, estabilizando adicionalmente el dímero (Carter, J. Immunol. Methods 248:7-15, 2001).

En una realización particular, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W, y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización particular, la molécula de Fab que se une específicamente a un antígeno de célula T activador se fusiona (opcionalmente mediante una molécula de Fab

que se une específicamente a un antígeno de célula diana) a la primera subunidad del dominio Fc (que comprende la modificación "de botón"). Sin restringirse a ninguna teoría en particular, la fusión de la molécula de Fab que une específicamente a un antígeno de célula T activador la subunidad que contiene el botón del dominio Fc minimizará (adicionalmente) la generación de moléculas de unión a antígeno que comprenden dos moléculas de Fab que se unen a un antígeno de célula T activador (choque estérico de dos polipéptidos que contienen botón).

Se encuentran contempladas otras técnicas para las modificaciones de CH3 que fuerzan la heterodimerización, a modo de alternativas según la invención y se describen en, por ejemplo, los documentos nº WO 96/27011, nº WO 98/050431, nº EP 1870459, nº WO 2007/110205, nº WO 2007/147901, nº WO 2009/089004, nº WO 2010/129304, nº WO 2011/90754, nº WO 2011/143545, nº WO 2012/058768, nº WO 2013/157954 y nº WO 2013/096291.

En una realización, alternativamente se utiliza el enfoque de heterodimerización tal como se describe en el documento nº EP 1870459 A1. Este enfoque se basa en la introducción de los aminoácidos con carga con cargas opuestas en posiciones específicas de aminoácidos en la interfaz de dominio CH3/CH3 entre las dos subunidades del dominio Fc. Una realización preferente de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención son las mutaciones de aminoácidos R409D, K370E en una de los dos dominios CH3 (del dominio Fc) y las mutaciones de aminoácidos D399K, E357K en el otro de los dominios CH3 del dominio Fc (numeración según el índice EU de Kabat).

En otra realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención comprende la mutación de aminoácidos T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, y adicionalmente las mutaciones de aminoácidos R409D, K370 en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos D399K, E357K en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (numeraciones según el índice EU de Kabat).

En otra realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención comprende las mutaciones de aminoácidos S354C y T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, o dicha molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende las mutaciones de aminoácidos Y349C y T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos S354C, T366S, L368A e Y407V en los dominios CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc y adicionalmente las mutaciones

de aminoácidos R409D y K370E en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos D399K y E357K en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (todas las numeraciones son según el índice EU de Kabat).

En una realización, alternativamente se utiliza el enfoque de heterodimerización tal como se describe en el documento nº WO2013/157953. En una realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácidos T366K y un segundo dominio CH3 comprende la mutación de aminoácidos L351D (numeraciones según el índice EU de Kabat). En una realización adicional, el primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido adicional L351K. En una realización adicional, el segundo dominio CH3 comprende además una mutación de aminoácido seleccionada de entre Y349E, Y349D y L368E (preferentemente L368E) (numeraciones según el índice EU de Kabat).

En una realización, alternativamente se utiliza el enfoque de heterodimerización tal como se describe en el documento nº WO2012/058768. En una realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos L351Y e Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácido T366A y K409F. En una realización adicional, el segundo dominio CH3 comprende una mutación de aminoácido adicional en la posición T411, D399, S400, F405, N390 o K392, por ejemplo seleccionada de entre a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E o T411W, b) D399R, D399W, D399Y o D399K, c) S400E, S400D, S400R, o S400K, d) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V o F405W, e) N390R, N390K o N390D, f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F o K392E (numeraciones según el índice EU de Kabat). En una realización adicional, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos L351Y e Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos T366V y K409F. En una realización adicional, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácidos Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos T366A y K409F. En una realización adicional, el segundo dominio CH3 comprende además las mutaciones de aminoácidos K392E, T411E, D399R y S400R (numeraciones según el índice EU de Kabat).

En una realización, puede utilizarse alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en el documento nº WO 2011/143545, por ejemplo con la modificación de aminoácidos en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste de 368 y 409 (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización, alternativamente se utiliza el enfoque de heterodimerización descrito en el documento nº WO 2011/090762, que también utiliza la tecnología de botón-en-ojal

descrita anteriormente. En una realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácidos T366K y un segundo dominio CH3 comprende la mutación de aminoácidos Y407A. En una realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácidos T366Y y un segundo dominio CH3 comprende la mutación de aminoácidos Y407T (numeraciones según el índice EU de Kabat).

En una realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T o su dominio Fc es de la subclase IgG₂ y se utiliza alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en el documento nº WO 2010/129304.

En una realización alternativa, una modificación estimuladora de asociación de la primera y segunda subunidades del dominio Fc comprende una modificación que media en efectos de orientación electrostática, por ejemplo tal como se indica en la publicación de patente PCT nº WO 2009/089004. Generalmente, dicho método implica la sustitución de uno o más residuos aminoácidos en la interfaz de las dos subunidades de dominio Fc por residuos aminoácidos cargados de manera que la formación de homodímero se convierte en electrostáticamente desfavorable y la heterodimerización se torna electrostáticamente favorable. En una de dichas realizaciones, un primer dominio CH3 comprende la sustitución de aminoácido de K392 o N392 con un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo el ácido glutámico (E) o el ácido aspártico (D), preferentemente K392D o N392D) y un segundo dominio CH3 comprende la sustitución de aminoácido D399, E356, D356 o E357 con un aminoácido cargado positivamente (por ejemplo la lisina (K) o la arginina (R), preferentemente D399K, E356K, D356K o E357K, y más preferentemente D399K y E356K). En una realización adicional, el primer dominio CH3 comprende además una sustitución de aminoácidos de K409 o R409 con un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); preferentemente K409D o R409D). En una realización adicional, el primer dominio CH3 comprende adicionalmente o alternativamente una sustitución de aminoácido de K439 y/o K370 con un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D)) (todas las numeraciones según el índice EU de Kabat).

En todavía una realización adicional, alternativamente se utiliza el enfoque de heterodimerización tal como se describe en el documento nº WO 2007/147901. En una realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos K253E, D282K y K322D y un segundo dominio CH3 que comprende las mutaciones de aminoácidos D239K, E240K y K292D (numeraciones según el índice EU de Kabat).

En todavía otra realización, alternativamente se utiliza el enfoque de heterodimerización tal como se describe en el documento nº WO 2007/110205.

En una realización, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos K392D y K409D, y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos D356K y D399K (numeración según el índice EU de Kabat).

Modificaciones del dominio Fc reductoras de la unión de receptores de Fc y/o de la función efectora

El dominio Fc confiere a la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T propiedades farmacocinéticas favorables, incluyendo una semivida sérica prolongada que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una proporción de distribuciones de tejido-sangre favorable. Simultáneamente puede, sin embargo, conducir a un direccionamiento no deseable de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T a células que expresan receptores de Fc y no a las células portadoras de antígeno preferentes. Además, la coactivación de las rutas de señalización de receptores de Fc puede conducir a la liberación de citoquinas, que, en combinación con las propiedades de activación de las células T y la semivida prolongada de la molécula de unión a antígeno, resulta en una activación excesiva de los receptores de citoquinas y efectos secundarios graves con la administración sistémica. La activación de las células inmunológicas (portadoras de receptores de Fc) diferentes de las células T puede incluso reducir la eficacia de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T debido a la potencial destrucción de las células T, por ejemplo por células NK.

De acuerdo con lo anterior, en realizaciones particulares, el dominio Fc de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T según la invención muestra una afinidad de unión reducida a un receptor de Fc y/o una función efectora reducida en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa. En una de dichas realizaciones, el dominio Fc (o la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende dicho dominio Fc) muestra menos de 50%, preferentemente menos de 20%, más preferentemente menos de 10% y todavía más preferentemente menos de 5% de la afinidad de unión para un receptor de Fc, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa (o una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende un dominio Fc de IgG₁ nativa) y/o menos de 50%, preferentemente menos de 20%, más preferentemente menos de 10% y todavía más preferentemente menos de 5% de la función efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa (o una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende un dominio Fc de IgG₁ nativa). En una realización, el dominio Fc (o la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T) no se une sustancialmente a un receptor de Fc y/o induce la función efectora. En una realización particular, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ . En una realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En una

realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. En una realización específica, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ humano activador, más concretamente Fc γ RIIIa, Fc γ RI o Fc γ RIIa humano, más concretamente Fc γ RIIIa humano. En una realización, la función efectora es uno o más seleccionado de entre el grupo de CDC, CCDA, FCDA y la secreción de citoquinas. En una realización particular, la función efectora es la CCDA. En una realización, el dominio Fc muestra una afinidad de unión sustancialmente similar al receptor de Fc neonatal (FcRn) en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa. Se consigue una unión sustancialmente similar a FcRn en el caso de que el dominio Fc (o la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende dicho dominio Fc) muestre una afinidad de unión superior a aproximadamente 70%, particularmente superior a aproximadamente 80%, más particularmente superior a aproximadamente 90% de la afinidad de unión de un dominio Fc de IgG₁ nativa (o la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende un dominio Fc de IgG₁ nativa) para FcRn.

En determinadas realizaciones, el dominio Fc se manipula para que presente una afinidad de unión reducida a un receptor de Fc y/o una función efectora reducida en comparación con un dominio Fc no manipulado. En realizaciones particulares, el dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende una o más mutaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión del dominio Fc a un receptor de Fc y/o la función efectora. Típicamente se encuentra presente la misma mutación o mutaciones de aminoácidos en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En una realización, la mutación de aminoácido reduce la afinidad de unión del dominio Fc a un receptor de Fc. En una realización, la mutación de aminoácido reduce la afinidad de unión del dominio Fc para un receptor de Fc en por lo menos 2 veces, en por lo menos 5 veces o en por lo menos 10 veces. En realizaciones en las que se encuentra presente más de una mutación de aminoácido que reduce la afinidad de unión del dominio Fc para el receptor de Fc, la combinación de dichas mutaciones de aminoácidos puede reducir la afinidad de unión del dominio Fc para un receptor de Fc en por lo menos 10 veces, en por lo menos 20 veces o incluso en por lo menos 50 veces. En una realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende un dominio Fc manipulado muestra una afinidad de unión inferior a 20%, particularmente inferior a 10%, más particularmente inferior a 5% de la afinidad de unión para un receptor de Fc en comparación con una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende un dominio Fc no manipulado. En una realización particular, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ . En algunas realizaciones, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En algunas realizaciones, el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. En una realización específica, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ humano activador, más

concretamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, más concretamente FcγRIIIa humano. Preferentemente, la unión de cada uno de dichos receptores se encuentra reducida. En algunas realizaciones, la afinidad de unión para un componente del complemento, concretamente la afinidad de unión para C1q, también se encuentra reducida. En una realización, la afinidad de unión para el receptor de Fc neonatal (FcRn) no se encuentra reducida. Una unión sustancialmente similar a FcRn, es decir, la conservación de la afinidad de unión del dominio Fc a dicho receptor, se consigue en el caso de que el dominio Fc (o la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende dicho dominio Fc) muestre una afinidad de unión superior a aproximadamente 70% de la afinidad de unión de una forma no manipulada del dominio Fc (o la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende dicha forma no manipulada del dominio Fc) a FcRn. El dominio Fc, o las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención que comprenden dicho dominio Fc, puede mostrar más de aproximadamente 80% e incluso más de aproximadamente 90% de dicha afinidad. En determinadas realizaciones, el dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T se manipula para que presente una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no manipulado. La función efectora reducida puede incluir, aunque sin limitación, una o más de los siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (FCDA) reducida, secreción de citoquinas reducida, incorporación de antígenos mediada por complejo inmunológica por parte de células presentadoras de antígenos reducida, unión reducida a células NK, unión reducida a macrófagos, unión reducida a monocitos, unión reducida a células polimorfonucleares, señalización directa reducida que induce apoptosis, entrecruzamiento reducido de anticuerpos unidos a diana, maduración de células dendríticas reducida o sensibilización de las células T reducida. En una realización, la función efectora reducida es una o más seleccionada de entre el grupo de CDC, CCDA reducida, CCDA reducida y FCDA reducida y secreción de citoquinas reducida. En una realización particular, la función efectora reducida es CCDA reducida. En una realización, la CCDA reducida es inferior a 20% de la CCDA inducida por un dominio Fc no manipulado (o una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende un dominio Fc no manipulado).

En una realización, la mutación de aminoácido que reduce la afinidad de unión del dominio Fc para un receptor de Fc y/o la función efectora es una sustitución de aminoácido. En una realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre el grupo de E233, L234, L235, N297, P331 y P329 (numeraciones según el índice EU de Kabat). En una realización más específica, el dominio Fc

comprende una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre el grupo de L234, L235 y P329 (numeraciones según el índice EU de Kabat). En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A (numeraciones según el índice EU de Kabat). En una de dichas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, particularmente un dominio Fc de IgG₁ humana. En una realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición P329.

En una realización más específica, la sustitución de aminoácido es P329A o P329G, particularmente P329G (numeraciones según el índice EU de Kabat). En una realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición P329 y un sustitución de aminoácido adicional en una posición seleccionada de E233, L234, L235, N297 y P331 (numeraciones según el índice EU de Kabat). En una realización más específica, la sustitución de aminoácido adicional es E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En algunas realizaciones particulares, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos en las posiciones P329, L234 y L235 (numeraciones según el índice EU de Kabat). En realizaciones más particulares, el dominio Fc comprende las mutaciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G ("P329G LALA"). En una de dichas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, particularmente un dominio Fc de IgG₁ humana. La combinación "P329G LALA" de sustituciones de aminoácidos anula prácticamente por completo la unión del receptor de Fcγ (así como del complemento) al dominio Fc de IgG₁ humana, tal como se indica en la publicación de patente PCT nº WO 2012/130831, incorporada como referencia en la presente memoria en su totalidad. El documento nº WO 2012/130831 describe además métodos para preparar dichos dominios Fc mutantes y métodos de determinación de sus propiedades, tales como la unión de receptores de Fc o funciones efectoras.

Los anticuerpos IgG₄ muestran una afinidad de unión reducida a los receptores de Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con los anticuerpos IgG₁. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención es un dominio Fc de IgG₄, particularmente un dominio Fc de IgG₄ humana. En una realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende las sustituciones de aminoácidos en la posición S228, concretamente la sustitución de aminoácido S228P (numeraciones según el índice EU de Kabat). Para reducir adicionalmente su afinidad de unión para un receptor de Fc y/o su función efectora, en una realización el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución de aminoácido en la posición L235, concretamente la sustitución de aminoácido L235E (numeraciones según el índice EU de Kabat). En otra realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende la sustitución de aminoácido en la posición P329, concretamente la sustitución de aminoácido P329G

(numeraciones según el índice EU de Kabat). En una realización particular, el dominio Fc de IgG₄ comprende las sustituciones de aminoácidos S228, L235 y P329, concretamente las sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y P329G (numeraciones según el índice EU de Kabat). Dichos mutantes de dominio Fc de IgG₄ y sus propiedades de unión de receptor de Fc γ se describen en la publicación de patente PCT nº WO 2012/130831, incorporada en la presente memoria como referencia en su totalidad.

En una realización particular, el dominio Fc que muestra una afinidad de unión reducida a un receptor de Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativo, es un dominio Fc de IgG₁ humana que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y opcionalmente P329G, o un dominio Fc de IgG₄ humana que comprende las sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y opcionalmente P329G (numeraciones según el índice EU de Kabat).

En determinadas realizaciones, la N-glucosilación del dominio Fc ha sido eliminada. En una de dichas realizaciones, el dominio Fc comprende una mutación de aminoácidos en la posición N297, particularmente una sustitución de aminoácido en que se sustituye la asparagina por alanina (N297A) o ácido aspártico (N297D) (numeraciones según el índice EU de Kabat).

Además de los dominios Fc descritos anteriormente en la presente memoria y en la publicación de patente PCT nº WO 2012/130831, los dominios Fc con unión de receptor de Fc y/o función efectora reducida incluyen además aquellas con sustitución de uno o más de los residuos de dominio Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente US nº 6.737.056) (numeraciones según el índice EU de Kabat). Entre dichos Fc mutantes se incluyen los Fc mutantes con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoácidas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo la Fc mutante denominada "DANA", con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente US nº 7.332.581).

Pueden prepararse dominios Fc mutantes mediante delección, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos utilizando métodos genéticos o químicos bien conocidos de la técnica. Entre los métodos genéticos pueden incluirse la mutagénesis sitio-dirigida de la secuencia de ADN codificante, la PCR, la síntesis génica y similares. Los cambios de nucleótidos correctos pueden verificarse mediante, por ejemplo, secuenciación.

La unión a receptores de Fc puede determinarse fácilmente, por ejemplo mediante ELISA o mediante resonancia del plasmón superficial (RPS) utilizando instrumentación estándar, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare) y receptores de Fc tales como los que

pueden obtenerse mediante expresión recombinante. En la presente memoria se describe un ensayo de unión adecuado de este tipo. Alternativamente, la afinidad de unión de los dominios Fc o moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras celulares que comprenden un dominio Fc para receptores de Fc pueden evaluarse utilizando líneas celulares que es conocido que expresan receptores de Fc particulares, tales como células NK humanas que expresan el receptor de FcγIIIa.

La función efectora de un dominio Fc, o de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende un dominio Fc, puede medirse mediante métodos conocidos de la técnica. En la presente memoria se describe un ensayo adecuado para la medición de la CCDA. Otros ejemplos de ensayos in vitro para evaluar la actividad de CCDA de una molécula de interés se describen en la patente US nº 5.500.362; Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063, 1986, y Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82:1499-1502, 1985; patente US nº 5.821.337; Bruggemann et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361, 1987. Alternativamente, pueden utilizarse métodos de ensayo no radioactivos (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc., Mountain View, CA)), y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Entre las células efectoras útiles para dichos ensayos se incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y las células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de CCDA de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo en un modelo animal tal como el dado a conocer en Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656, 1998.

En algunas realizaciones, la unión del dominio Fc a un componente del complemento, concretamente la afinidad de unión para C1q, también se encuentra reducida. De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones en las que el dominio Fc ha sido manipulado para presentar una función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye una CDC reducida. Pueden llevarse a cabo ensayos de unión de C1q para determinar si la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T es capaz de unirse a C1q y, por lo tanto, si presenta actividad de CDC. Ver, por ejemplo, el ELISA de unión de C1q y C3c en los documentos nº WO 2006/029879 y nº WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede llevarse a cabo un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163-171, 1996; Cragg M.S. et al., Blood 101:1045-1052, 2003; y Cragg M.S. y M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743, 2004).

Fracciones de unión a antígeno

La molécula de unión a antígeno de la invención es biespecífica, es decir, comprende por lo menos dos fracciones de unión a antígeno capaces de unión específica a dos

determinantes antigénicos diferentes. Según realizaciones particulares de la invención, las fracciones de unión a antígeno son moléculas de Fab (es decir, dominios de unión a antígeno compuestos de una cadena pesada y una cadena ligera, comprendiendo cada una un dominio variable y un dominio constante). En una realización, dichas moléculas de Fab son humanas. En otra realización, dichas moléculas de Fab son humanizadas. En todavía otra realización, dichas moléculas de Fab comprenden dominios constantes de cadenas pesada y ligera humanas.

Preferentemente, por lo menos una de las fracciones de unión a antígeno es una molécula de Fab entrecruzada. Dicha modificación reduce el apareamiento incorrecto de las cadenas pesadas y ligeras de diferentes moléculas de Fab, mejorando de esta manera el rendimiento y la pureza de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención en la producción recombinante. En una molécula de Fab entrecruzado particular útil para la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención, se intercambian los dominios variables de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab (VL y VH, respectivamente). Sin embargo, incluso con este intercambio de dominios, la preparación de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T puede comprender determinados productos secundarios debido a una interacción denominada de Bence Jones entre las cadenas pesadas y ligeras incorrectamente apareadas (ver Schaefer et al., PNAS 108:11187-11191, 2011). Para reducir adicionalmente el apareamiento incorrecto de las cadenas pesadas y ligeras de diferentes moléculas de Fab e incrementar de esta manera la pureza y el rendimiento de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T deseada, según la presente invención pueden introducirse aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones de aminoácidos específicas en los dominios CH1 y CL de la molécula o moléculas de Fab de unión específica a un antígeno de célula diana, o de la molécula de Fab de unión específica a un antígeno de célula T activador. Se realizan modificaciones de carga en la molécula o moléculas convencionales de Fab comprendidas en la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T (tal como se muestra, por ejemplo, en las figuras 1A-C, G-J) o en la molécula o moléculas de Fab entrecruzadas comprendidas en la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T (tal como la mostrada, por ejemplo, en la figura 1D-F, K-N) (pero no en ambas). En realizaciones particulares, las modificaciones de carga se realizan en la molécula o moléculas de Fab convencionales comprendidas en la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T (que en realizaciones particulares se une específicamente al antígeno de la célula diana).

En una realización particular según la invención, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T es capaz de la unión simultánea a un antígeno de célula diana, particularmente un antígeno de célula tumoral y un antígeno de célula T activador, particularmente CD3. En una realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T es capaz de entrecruzar una célula T y una célula diana mediante la unión simultánea a un antígeno de célula diana y un antígeno de célula T activador. En una realización todavía más particular, dicha unión simultánea resulta en la lisis de la célula diana, particularmente una célula tumoral. En una realización, dicha unión simultánea resulta en la activación de la célula T. En otras realizaciones, dicha unión simultánea resulta en una respuesta celular de un linfocito T, particularmente un linfocito T citotóxico, seleccionado de entre el grupo de: proliferación, diferenciación, secreción de citoquinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. En una realización, la unión de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T al antígeno de células T activador, particularmente CD3, sin unión simultánea al antígeno de célula diana no resulta en la activación de las células T.

En una realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T es capaz de redirigir la actividad citotóxica de una célula T a una célula diana. En una realización particular, dicho redireccionamiento es independiente de la presentación de antígeno peptídico mediada por el CMH por parte de la célula diana y/o de la especificidad de la célula T.

Particularmente una célula T según cualquiera de las realizaciones de la invención es una célula T citotóxica. En algunas realizaciones, la célula T es una célula T CD4⁺ o CD8⁺, particularmente una célula T CD8⁺.

Fracción de unión a antígeno activadora de células T

La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención comprende por lo menos una fracción de unión a antígeno, particularmente una molécula de Fab, que se une específicamente a un antígeno de células T activador (también denominada en la presente memoria "fracción de unión a antígeno activadora de células T" o "molécula de Fab de unión a antígeno activadora de células T"). En una realización particular, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende no más de una fracción de unión a antígeno capaz de unión específica a un antígeno de células T activador. En una realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T proporciona una unión monovalente al antígeno de células T activado.

En realizaciones particulares, la fracción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de células T activador es una molécula de Fab entrecruzada tal como se indica en la presente memoria, es decir, una molécula de Fab en la que los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL de las cadenas pesada y ligera de Fab se encuentran intercambiadas/sustituidas una por otra. En dichas realizaciones, la fracción o fracciones de unión a antígeno que se unen específicamente a un antígeno de célula diana es una molécula de Fab convencional. En realizaciones en las que hay más de una fracción de unión a antígeno, en particular una molécula de Fab, que se une específicamente a un antígeno de célula diana comprendido en la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, la fracción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de células T activador preferentemente es una molécula de Fab entrecruzada y las fracciones de unión a antígeno que se unen específicamente a un antígeno de célula diana son moléculas de Fab convencionales.

En realizaciones alternativas, la fracción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de célula T activador es una molécula de Fab convencional. En dichas realizaciones, la fracción o fracciones de unión a antígeno que se unen específicamente a un antígeno de células diana es una molécula de Fab entrecruzada tal como se indica en la presente memoria, es decir, los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL de las cadenas pesada y ligera de Fab se encuentran intercambiadas/sustituidas una por otra.

En una realización particular, el antígeno activador de células T es CD3, particularmente CD3 humano (SEC ID nº 1) o CD3 de Cynomolgus (SEC ID nº 2), más particularmente CD3 humana. En una realización particular, la fracción de unión a antígeno de células T activadora presenta reactividad cruzada para (es decir, se une específicamente a) CD3 humano y de Cynomolgus. En algunas realizaciones, el antígeno de células T activador es la subunidad epsilon de CD3 (CD3-epsilon).

En algunas realizaciones, la fracción de unión a antígeno activadora de células T se une específicamente a CD3, particularmente a CD3-epsilon, y comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (RDC) de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 4, SEC ID nº 5 y SEC ID nº 6, y por lo menos una CDR de cadena ligera seleccionada de entre el grupo de SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10.

En una realización, la fracción de unión a antígeno de unión a CD3, en particular la molécula de Fab, comprende una región variable de cadena pesada que comprende la

RDC1 de cadena pesada de SEC ID nº 4, la RDC2 de cadena pesada de SEC ID nº 5, la RDC3 de cadena pesada de SEC ID nº 6 y una región variable de cadena ligera que comprende la RDC1 de cadena ligera de SEC ID nº 8, la RDC2 de cadena ligera de SEC ID nº 9 y la RDC3 de cadena ligera de SEC ID nº 10.

En otra realización, la fracción de unión a antígeno de unión a CD3, en particular la molécula de Fab, comprende una región variable de cadena pesada que comprende la RDC1 de cadena pesada de SEC ID nº 4, la RDC2 de cadena pesada de SEC ID nº 46, la RDC3 de cadena pesada de SEC ID nº 6 y una región variable de cadena ligera que comprende la RDC1 de cadena ligera de SEC ID nº 47, la RDC2 de cadena ligera de SEC ID nº 9 y la RDC3 de cadena ligera de SEC ID nº 10.

En una realización, la fracción de unión a antígeno de unión a CD3, en particular la molécula de Fab, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que es por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a la secuencia SEC ID nº 3, y una secuencia de región variable de cadena ligera que es por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a SEC ID nº 7.

En una realización, la fracción de unión a antígeno de unión a CD3, en particular la molécula de Fab, comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7.

En una realización, la fracción de unión a antígeno de unión a CD3, en particular la molécula de Fab, comprende la secuencia de región variable de cadena pesada de SEC ID nº 3 y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEC ID nº 7.

En una realización, la fracción de unión a antígeno de unión a CD3, en particular la molécula de Fab, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que es por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a la secuencia SEC ID nº 48, y una secuencia de región variable de cadena ligera que es por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a SEC ID nº 49.

En una realización, la fracción de unión a antígeno de unión a CD3, en particular la molécula de Fab, comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 48 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 49.

En una realización, la fracción de unión a antígeno de unión a CD3, en particular la molécula de Fab, comprende la secuencia de región variable de cadena pesada de SEC ID nº 48 y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEC ID nº 49.

Fracción de unión a antígeno de las células diana

La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención comprende por lo menos una fracción de unión a antígeno, en particular una molécula de Fab, que se une específicamente a ACE (antígeno de célula diana). En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende dos fracciones de unión a antígeno, particularmente moléculas de Fab, que se unen específicamente a ACE. En una realización particular de entre dichas realizaciones, cada una de dichas fracciones de unión a antígeno se une específicamente al mismo determinante antigénico. En una realización todavía más particular, la totalidad de dichas fracciones de unión a antígeno son idénticas, es decir, comprenden las mismas secuencias de aminoácidos, incluyendo las mismas sustituciones de aminoácidos en los dominios CH1 y CL, tal como se indica en la presente memoria (en caso de existir). En una realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a ACE. En una realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende no más de dos fracciones de unión a antígeno, particularmente moléculas de Fab, que se unen específicamente a ACE.

En realizaciones particulares, la fracción o fracciones de unión a antígeno que se unen específicamente a ACE son moléculas de Fab convencionales. En dichas realizaciones, la fracción o fracciones de unión a antígeno que se unen específicamente a un antígeno de células T activador es una molécula de Fab entrecruzada tal como se indica en la presente memoria, es decir, una molécula de Fab en la que los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL de las cadenas pesada y ligera de Fab se encuentran intercambiadas/sustituidas una por otra.

En realizaciones alternativas, la fracción o fracciones de unión a antígeno que se unen específicamente a ACE son moléculas de Fab entrecruzadas tal como se indica en la presente memoria, es decir, una molécula de Fab en la que los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL de las cadenas pesada y ligera de Fab se encuentran intercambiadas/sustituidas una por otra. En dichas realizaciones, la fracción o fracciones de unión a antígeno que se unen específicamente a un antígeno de célula T activador es una molécula de Fab convencional.

La fracción de unión a ACE es capaz de dirigir la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T a un sitio diana, por ejemplo a un tipo específico de célula tumoral que expresa ACE.

En una realización, la fracción de unión a antígeno, en particular la molécula de Fab, que se une específicamente a ACE comprende una región variable de cadena pesada que comprende la región determinante de complementariedad (RDC) de cadena pesada 1 de SEC ID nº 14, la CDR 2 de cadena pesada de SEC ID nº 15 y la CDR 3 de cadena pesada de SEC ID nº 16 y una región variable de cadena ligera que comprende la RDC1 de cadena ligera de SEC ID nº 17, la CDR 2 de cadena ligera de SEC ID nº 18 y la CDR 3 de cadena ligera de SEC ID nº 19. En una realización adicional, la fracción de unión a antígeno, en particular la molécula de Fab, que se une específicamente a ACE comprende una región variable de cadena pesada que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia SEC ID nº 22, y una región variable de cadena ligera que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a SEC ID nº 23. En una realización todavía adicional, la fracción de unión a antígeno, en particular la molécula de Fab, que se une específicamente a ACE comprende la secuencia de región variable de cadena pesada SEC ID nº 22 y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEC ID nº 23. En una realización particular, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia SEC ID nº 34, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 36, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 37, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 38. En una realización particular adicional, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 34, una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 36, una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 37 y una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 38. En otra realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 34, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 37, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 38, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 39. En una realización adicional, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 34, una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 37, una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 38 y una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 39. En todavía otra realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 34, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 36, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 38, y un

polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 40. En una realización adicional, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 34, una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 36, una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 38 y una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 40. En una realización adicional, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 34, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 36, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 38, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 41. En una realización adicional, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 34, una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 36, una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 38 y una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 41.

En todavía otra realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 34, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 50, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 51, y un polipéptido que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la secuencia SEC ID nº 52. En una realización adicional, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T comprende una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 34, una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 50, una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 51 y una secuencia polipeptídica de SEC ID nº 52.

Anticuerpos del ACE

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo humanizado, que se une específicamente a ACE, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la región determinante de complementariedad (RDC) de cadena pesada 1 de SEC ID nº 14, la CDR 2 de cadena pesada de SEC ID nº 15 y la CDR 3 de cadena pesada de SEC ID nº 16 y una región variable de cadena ligera que comprende la RDC1 de cadena ligera de SEC ID nº 17, la CDR 2 de cadena ligera de SEC ID nº 18 y la CDR 3 de cadena ligera de SEC ID nº 19.

En una realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de SEC ID nº 22, y una región variable de cadena ligera que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica

a SEC ID nº 23. En una realización adicional, la fracción de unión a antígeno, en particular la molécula de Fab, que se une específicamente a ACE comprende la secuencia de región variable de cadena pesada SEC ID nº 22 y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEC ID nº 23. En una realización, el anticuerpo es una molécula de Fab.

Polinucleótidos

La invención proporciona además polinucleótidos aislados codificantes de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T tal como se indica en la presente memoria o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, dicho fragmento es un fragmento de unión a antígeno.

Los polinucleótidos codificantes de moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención pueden expresarse en forma de un único polinucleótido que codifica la molécula biespecífica entera de unión a antígeno activadora de células T o como múltiples (por ejemplo dos o más) polinucleótidos que se coexpresan.

Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se coexpresan pueden asociarse mediante, por ejemplo, enlaces disulfuro u otros medios para formar una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T funcional. Por ejemplo, la parte de cadena ligera de una molécula de Fab puede encontrarse codificada por un polinucleótido separado de la parte de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende la parte de cadena pesada de la molécula de Fab, una subunidad de dominio Fc y opcionalmente (parte de) otra molécula de Fab. Al coexpresarse, los polipéptidos de cadena pesada se asocian con los polipéptidos de cadena pesada para formar la molécula de Fab. En otro ejemplo, la parte de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende una de las dos subunidades de dominio Fc y opcionalmente (parte de) una o más moléculas Fab podría encontrarse codificada por un polinucleótido separado de la parte de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T que comprende la otra de las dos subunidades de dominio Fc y opcionalmente (parte de) una molécula de Fab. Al coexpresarse, las subunidades de dominio Fc se asocian para formar el dominio Fc.

En algunas realizaciones, el polinucleótido aislado codifica la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T entera según la invención tal como se indica en la presente memoria. En otras realizaciones, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido comprendido en la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención tal como se indica en la presente memoria.

En determinadas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otras realizaciones, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN de la presente invención puede ser de cadena sencilla o de doble cadena.

Métodos recombinantes

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención pueden obtenerse, por ejemplo, mediante síntesis peptídica de estado sólido (por ejemplo la síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante de uno o más polinucleótidos codificantes de la molécula (fragmento) biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para la clonación adicional y/o expresión en una célula huésped. Dicho polinucleótido puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales. En una realización se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención. Pueden utilizarse métodos que son bien conocidos por el experto en la materia para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una molécula (fragmento) biespecífico de unión a antígeno activador de células T conjuntamente con señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas. Entre estos métodos se incluyen técnicas *in vitro* de ADN recombinante, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; y Ausubel *et al.*, *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y., 1989. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido o virus, o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que se clona el polinucleótido codificante de la molécula (fragmento) biespecífica de unión a antígeno activadora de células T (es decir, la región codificante) en asociación operable con un promotor y/o otros elementos de control de la transcripción o traducción. Tal como se utiliza en la presente memoria, una “región codificante” es una parte de un ácido nucleico que consiste de codones traducidos en aminoácidos. Aunque un “codón de parada” (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse parte de una región codificante, en caso de encontrarse presente, mientras que cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo promotores, sitios de unión ribosómica, terminadores de transcripción, intrones, regiones 5' y 3' no traducidas y similares, no son parte de una región codificante. Pueden encontrarse presentes dos o más regiones codificantes descritas en un solo constructo polinucleótido, por ejemplo en un solo vector, o en constructos polinucleótidos separados, por ejemplo en vectores separados (diferentes).

Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo un vector descrito en la presente memoria puede codificar una o más polipéptidos, que se separan post-traduccionalmente o cotraduccionalmente en las proteínas finales mediante corte proteolítico. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, fusionadas o no fusionadas con un polinucleótido codificante de la molécula (fragmento) biespecífica de unión antígeno activadora de células T de la invención, o variante o derivado del mismo. Entre las regiones codificantes heterólogas se incluyen, aunque sin limitación, elementos especializados o motivos, tales como un péptido de señal secretoria o un dominio funcional heterólogo. Una asociación operable se produce en el caso de que una región codificante de un producto génico, por ejemplo un polipéptido, se asocie a una o más secuencias reguladoras de manera que sitúa la expresión del producto génico bajo la influencia o el control de la secuencia o secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado a la misma) se encuentran “operablemente asociados” en el caso de que la inducción de la función del promotor resulte en la transcripción de ARNm codificante del producto génico deseado y en el caso de que la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiera con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión de dirigir la expresión del producto génico o de interferir con la capacidad del molde de ADN de ser transcrito. De esta manera, una región promotora se encontraría operablemente asociada a un ácido nucleico codificante de un polipéptido en el caso de que el promotor fuera capaz de inducir la transcripción de dicho ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de un tipo de célula que dirige una transcripción sustancial del ADN únicamente en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, aparte de un promotor, por ejemplo intensificadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden asociarse operablemente al polinucleótido para dirigir la transcripción específica de un tipo celular. Los promotores y otras regiones de control de la transcripción que resultan adecuados se dan a conocer en la presente memoria. Una diversidad de regiones de control de la transcripción es conocida por el experto en la materia. Entre ellas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, regiones de control de la transcripción que funcionan en células de vertebrado, tales como, aunque sin limitarse a ellos, segmentos de promotor e intensificador procedentes de citomegalovirus (por ejemplo el promotor temprano inmediato, conjuntamente con el intrón A), el virus 40 del simio (por ejemplo el promotor temprano) y los retrovirus (tales como, por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous). Entre otras regiones de control de la transcripción se incluyen aquéllas derivadas de genes de vertebrado, tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovina y β -globina de conejo, así como otras secuencias capaces

de controlar la expresión génica en las células eucarióticas. Entre las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales se incluyen los promotores e intensificadores específicos de un tejido, así como promotores inducibles (por ejemplo los promotores inducibles por tetraciclinas). De manera similar, el experto ordinario en la materia conocerá una diversidad de elementos de control de la transcripción. Entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, sitios de unión ribosómica, codones de inicio y terminación de la traducción, y elementos derivados de sistemas víricos (particularmente un sitio interno de entrada ribosómica, o IRES, también denominado secuencia CITE). El casete de expresión también puede incluir otros elementos, tales como un origen de replicación y/o elementos de integración cromosómica tales como repeticiones terminales largas retrovíricas (RTL) o repeticiones terminales invertidas (RTI) víricas adenoasociadas (VAA).

Las regiones codificantes polinucleótidas y de ácidos nucleicos de la presente memoria pueden encontrarse asociadas a regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretorios o de señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, en el caso de que se desee la secreción de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, el ADN codificante de una secuencia de señal puede situarse antes del ácido nucleico codificante de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención o fragmento de la misma. Según la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por las células de mamífero presentan un péptido de señal o secuencia líder secretoria que resulta cortada de la proteína madura tras iniciarse la exportación de la cadena proteica en crecimiento a través del retículo endoplasmático rugoso. El experto ordinario en la materia conocerá que los polipéptidos secretados por las células de vertebrado generalmente presentan un péptido de señal fusionado al extremo N-terminal del polipéptido, que resulta cortado del polipéptido traducido, produciendo una forma secretada o “madura” del polipéptido. En determinadas realizaciones, se utiliza el péptido de señal nativo, por ejemplo un péptido de señal de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina o un derivado funcional de dicha secuencia que conserve la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido operablemente asociado al mismo. Alternativamente, puede utilizarse un péptido de señal de mamífero heterólogo, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo salvaje puede sustituirse por la secuencia líder del activador del plasminógeno tisular humano (APT) o de la β -glucuronidase de ratón.

El ADN codificante de una secuencia proteica corta que podría utilizarse para facilitar la purificación posterior (por ejemplo una etiqueta de histidinas) o ayudar en el marcaje de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T puede incluirse dentro o

en los extremos del polinucleótido codificante de la molécula (fragmento) biespecífica de unión a antígeno activadora de células.

En una realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. En determinadas realizaciones se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de la invención. Los polinucleótidos y vectores puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, descritas en la presente memoria en relación a polinucleótidos y vectores, respectivamente. En una de dichas realizaciones una célula huésped comprende (por ejemplo ha sido transformada o transfectada con) un vector que comprende un polinucleótido que codifica (parte de) una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de sistema celular que puede manipularse para generar las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención o fragmentos de las mismas. Las células huésped adecuadas para replicar y para proporcionar soporte a la expresión de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T son bien conocidas de la técnica. Dichas células pueden transfectarse o transducirse según resulte apropiado al vector de expresión particular y pueden cultivarse grandes cantidades de células que contienen vector para la siembra de fermentadores a gran escala con el fin de obtener suficientes cantidades de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T para aplicaciones clínicas. Entre las células huésped adecuadas se incluyen microorganismos procarióticos, tales como *E. coli*, o diversas células eucarióticas, tales como células de ovario de hámster chino (OHC), células de insecto, o similares. Por ejemplo, pueden producirse polipéptidos en bacterias, en particular en el caso de que la glucosilación no resulte necesaria. Tras la expresión, el polipéptido puede aislarse a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente. Además de los procariotas, los microbios eucarióticos, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas rutas de glucosilación han sido "humanizadas", resultando en la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Ver Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414, 2004, y Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215, 2006. También se derivan células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) a partir de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Entre los ejemplos de células de invertebrado se incluyen las células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas que pueden utilizarse conjuntamente con células de insecto, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También pueden utilizarse

cultivos de células vegetales como huéspedes. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.959.177, nº 6.040.498, nº 6.420.548, nº 7.125.978 y nº 6.417.429 (que describe la tecnología PLANTIBODIESTM para producir anticuerpos en plantas transgénicas). También pueden utilizarse células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden resultar útiles líneas celulares de mamífero adaptadas para el crecimiento en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea renal de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7), la línea renal embrionaria humana (células 293 o 293T tal como se indica en, por ejemplo, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59, 1977), las células renales de hámster neonato (BHK), las células de sertoli de ratón (células TM4 tal como se indica en, por ejemplo, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251, 1980), las células renales de mono (CV1), las células renales de mono verde africano (VERO-76), las células de carcinoma cervical humano (HELA), las células renales caninas (MDCK), las células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A), las células pulmonares humanas (W138), las células hepáticas humanas (Hep G2), las células de tumor mamario de ratón (MMT 060562), las células TRI (tal como se indica en, por ejemplo, Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68, 1982), las células MRC 5 y las células FS4. Entre otras líneas celulares huésped de mamífero útiles se incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo las células CHO dhfr⁻ (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980) y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, ver, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, vol. 248 (B.K.C. Lo (editor), Humana Press, Totowa, NJ), páginas 255-268 (2003). Entre las células huésped se incluyen las células en cultivo, por ejemplo las células en cultivo de mamífero, las células de levadura, las células de insecto, las células bacterianas y las células vegetales, entre otras, aunque también las células comprendidas en un animal transgénico, planta transgénica o tejido vegetal o animal en cultivo. En una realización, la célula huésped es eucariótica, por ejemplo una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfocítica (por ejemplo una célula Y0, NS0 ó Sp20).

Se conocen de la técnica tecnologías estándares para expresar genes foráneos en dichos sistemas. Las células que expresan un polipéptido que comprende la cadena pesada o ligera de un dominio de unión a antígeno, tal como un anticuerpo, pueden manipularse de manera que también expresen la otra de las cadenas de anticuerpo, de manera que el producto expresado sea un anticuerpo que presenta tanto una cadena pesada como una cadena ligera.

En una realización se proporciona un método para producir una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención, en el que el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido codificante de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, tal como se proporciona en la presente memoria, bajo condiciones adecuadas para la expresión de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, y recuperar la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T a partir de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

Los componentes de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T se fusionan genéticamente entre sí. La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T puede diseñarse de manera que sus componentes se fusionen directamente entre sí o indirectamente mediante una secuencia conectora. La composición y longitud del conector pueden determinarse según métodos bien conocidos de la técnica y pueden someterse a ensayo para su eficacia. Se encuentran ejemplos de secuencias conectoras en diferentes componentes de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T en las secuencias proporcionadas en la presente memoria. También pueden incluirse secuencias adicionales para incorporar un sitio de corte con el fin de separar los componentes individuales de la fusión, si se desea, por ejemplo una secuencia de reconocimiento de endopeptidasa.

En determinadas realizaciones, la fracción o fracciones de unión a antígeno de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T comprenden por lo menos una región variable de anticuerpo capaz de unión a un determinante antigénico. Las regiones variables pueden formar parte y derivarse de anticuerpos naturales o no naturales y fragmentos de los mismos. Los métodos para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales son bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Pueden construirse anticuerpos no naturales utilizando síntesis peptídica en fase sólida; pueden producirse recombinantemente (por ejemplo tal como se indica en la patente US nº 4.186.567) o pueden obtenerse, por ejemplo, mediante cribado de bibliotecas combinatoriales que comprenden cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.969.108 de McCafferty).

Puede utilizarse cualquier especie animal de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o región variable en las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o regiones variables no limitativas que resultan útiles en la

presente invención pueden ser de origen murino, de primate o humano. En el caso de que la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T esté destinada al uso humano, puede utilizarse una forma quimérica de anticuerpo en la que las formas constantes del anticuerpos proceden de un ser humano. También puede prepararse una forma humanizada o totalmente humana del anticuerpo según métodos bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.565.332, de Winter). La humanización puede llevarse a cabo mediante diversos métodos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, (a) la injertación de las RDC no humanas (por ejemplo el anticuerpo donante) en regiones de marco y constantes humanas (por ejemplo el anticuerpo receptor) con o sin retención de los residuos de marco críticos (por ejemplo aquellos que resultan importantes para conservar una buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpo), (b) la injertación únicamente de las regiones determinantes de especificidad no humanas (RDE o a-RDC; los residuos críticos para la interacción de anticuerpo-antígeno) en las regiones de marco y constantes humanas, o (c) el trasplante de los dominios variables no humanos enteros, aunque "recubriéndolos" con una sección de tipo humano mediante sustitución de residuos de superficie. Los anticuerpos humanizados y métodos de preparación de los mismos se revisan en, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633, 2008, y se describen adicionalmente en, por ejemplo, Riechmann et al., *Nature* 332:323-329, 1988; Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033, 1989; patentes US nº 5.821.337, nº 7.527.791, nº 6.982.321 y nº 7.087.409; Jones et al., *Nature* 321:522-525, 1986; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855, 1984; Morrison y Oi, *Adv Immunol* 44:65-92, 1988; Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536, 1988; Padlan, *Molec. Immun.* 31(3):169-217, 1994; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34, 2005 (que describe la injertación de RDE (a-RDC)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498, 1991 (que describe la "resuperficialización"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60, 2005 (que describe la "reorganización de FR") y Osbourn et al., *Methods* 36:61-68, 2005, y Klimka et al., *Br. J. Cancer* 83:252-260, 2000 (que describe el enfoque de "selección guiada" a la reorganización de FR). Pueden producirse anticuerpos humanos y regiones variables humanas utilizando diversas técnicas conocidas. Se describen de manera general anticuerpos humanos en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-784, 2001, y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459, 2008. Las regiones variables humanas pueden formar parte y derivarse de anticuerpos monoclonales humanos preparados mediante el método del hibridoma (ver, por ejemplo, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51 a 63 (Marcel Dekker Inc., New York, 1987). Los anticuerpos humanos y regiones variables humanas también pueden prepararse mediante la administración de un inmunógeno en un animal transgénico que ha sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta al reto antigénico (ver, por ejemplo, Lonberg, *Nat. Biotech.*

23:1117-1125, 2005). Los anticuerpos humanos y regiones variables humanos también pueden generarse mediante el aislamiento de las secuencias de región variable del clon de Fv seleccionadas de entre las bibliotecas de expresión fágicas de origen humano (ver, por ejemplo, Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001), y McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352:624-628, 1991. Los fagos típicamente expresan fragmentos de anticuerpo, en forma de fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) o como fragmentos Fab.

En determinadas realizaciones, las fracciones de unión a antígeno que resultan útiles en la presente invención se manipulan para que presenten una afinidad de unión mejorada siguiendo, por ejemplo, los métodos dados a conocer en la solicitud publicada de patente US nº 2004/0132066, el contenido completo de la cual se incorpora como referencia en la presente memoria. La capacidad de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención de unirse a un determinante antigénico específico puede medirse mediante un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) u otra técnica que resulte familiar al experto en la materia, por ejemplo la técnica de resonancia del plasmón superficial (analizada en un sistema BIACORE T100) (Liljeblad et al., *Glyco. J.* 17:323-329, 2000) y ensayos de unión tradicionales (Heeley R.P., *Endocr. Res.* 28:217-229, 2002). Pueden utilizarse ensayos de competición para identificar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o dominio variable que compita con un anticuerpo de referencia para la unión a un antígeno particular, por ejemplo un anticuerpo que compita con el anticuerpo V9 para la unión a CD3. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo en competición se une al mismo epítipo (por ejemplo un epítipo lineal o un epítipo conformacional) que se une al anticuerpo de referencia. Se proporcionan métodos ejemplares detallados para el mapeado de un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris, "Epitope Mapping Protocols", en: *Methods in Molecular Biology*, vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ), 1996. En un ensayo de competición ejemplar, se incuba antígeno inmovilizado (por ejemplo CD3) en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al antígeno (por ejemplo el anticuerpo V9, descrito en la patente US nº 6.054.297) y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a ensayo para su capacidad de competir con el primer anticuerpo para la unión al antígeno. El segundo anticuerpo puede encontrarse presente en un sobrenadante del hibridoma. A modo de control se incuba antígeno inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Tras la incubación bajo condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a antígeno, se elimina el anticuerpo no unido en exceso y se mide la cantidad de marcaje asociado al antígeno inmovilizado. En el caso de que el marcaje asociado al antígeno inmovilizado se reduzca sustancialmente en la muestra de ensayo respecto a la

muestra de control, el resultado indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo para la unión al antígeno. Ver Harlow y Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T preparadas tal como se indica en la presente memoria pueden purificarse mediante técnicas conocidas, tales como la cromatografía líquida de alto rendimiento, la cromatografía de intercambio iónico, la electroforesis en gel, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Las condiciones reales utilizadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores tales como la carga neta, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, etc. y resultarán evidentes para el experto en la materia. Para la purificación mediante cromatografía de afinidad puede utilizarse un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T. Por ejemplo, para la purificación mediante cromatografía de afinidad de moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención puede utilizarse una matriz con proteína A o con proteína G. Puede utilizarse la cromatografía de afinidad con proteína A o G y la cromatografía de exclusión por tamaño secuencialmente a fin de aislar la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T esencialmente tal como se indica en los Ejemplos. La pureza de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T puede determinarse mediante cualquiera de entre una diversidad de métodos analíticos bien conocidos, entre ellos la electroforesis en gel, la cromatografía líquida de alto rendimiento, y similares. Por ejemplo, las proteínas de fusión de cadena pesada expresadas tal como se indica en los Ejemplos se demostró que se encontraban intactas y correctamente ensambladas, tal como se demostró mediante SDS-PAGE reductora (ver, por ejemplo, la figura 4). Se resolvieron tres bandas en aproximadamente Mr 25.000, Mr 50.000 y Mr. 75.000, correspondientes a los pesos moleculares predichos de la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T y de la proteína de fusión de cadena pesada/cadena ligera.

Ensayos

Pueden identificarse moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T proporcionadas en la presente memoria, cribarse o caracterizarse para sus propiedades físicas/químicas y/o actividad biológicas mediante diversos ensayos conocidos de la técnica.

Ensayos de afinidad

La afinidad de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T para un receptor de Fc o un antígeno diana puede determinarse según los métodos indicado en los Ejemplos mediante resonancia del plasmón superficial (RPS), utilizando instrumentación estándar, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare) y receptores o proteínas diana tales como las que pueden obtenerse mediante expresión recombinante. Alternativamente, la unión de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T para diferentes receptores o antígenos diana pueden evaluarse mediante líneas celulares que expresan el receptor o antígeno diana particular, por ejemplo mediante citometría de flujo (FACS). Una realización ilustrativo y ejemplar específica para la medición de la afinidad de unión se describe a continuación y en los Ejemplos, posteriormente.

Según una realización, se mide KD mediante resonancia del plasmón superficial utilizando un aparato BIAcore® T100 (GE Healthcare) a 25°C.

Para analizar la interacción entre la parte Fc y los receptores de Fc, se capturó receptor de Fc recombinante etiquetado con His mediante un anticuerpo anti-penta-his (Qiagen) inmovilizado sobre chips CM5 y se utilizaron como analitos los constructos biespecíficos. Brevemente, se activaron chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare) con hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se diluyó anticuerpo anti-penta-his con acetato sódico 10 mM, pH 5,0, hasta una concentración de 40 µg/ml antes de inyectar a una caudal de 5 µl/min. hasta alcanzar aproximadamente 6.500 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del ligando, se inyectó etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. A continuación, se capturó el receptor de Fc durante 60 s a 4 o 10 nM. Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de cuatro veces del constructo biespecífico (intervalo de entre 500 nM y 4.000 nM) en HBS-EP (GE Healthcare, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM; surfactante P20 al 0,05%, pH 7,4) a 25°C a un caudal de 30 µl/min. durante 120 s.

Para determinar la afinidad para el antígeno diana, se capturaron constructos biespecíficos con un anticuerpo específico anti-Fab humano (GE Healthcare) que se inmovilizó sobre un chip sensor CM5 tal como se describe para el anticuerpo anti-penta-His. La cantidad final de proteína acoplada era de aproximadamente 12.000 UR. Se capturaron los constructos biespecíficos durante 90 s a 300 nM. Se pasaron los antígenos diana por las celdas de

flujo durante 180 s en un intervalo de concentraciones de entre 250 y 1.000 nM a un caudal de 30 μ l/min. Se realizó un seguimiento de la disociación durante 180 s.

Se corrigieron las diferencias mayores del índice refractivo mediante sustracción de la respuesta obtenida de una celda de flujo de referencia. Se utilizó la respuesta de estado estable para derivar la constante de disociación K_D mediante ajuste de curvas no lineales de la isoterma de unión de Langmuir. Las tasas de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) se calcularon utilizando un modelo simple de unión uno a uno de Langmuir (software de evaluación BIACORE® T100, versión 1.1.1) mediante ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y de disociación. La constante de equilibrio de disociación (K_D) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on} . Ver, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881, 1999.

Ensayos de actividad

La actividad biológica de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención puede medirse mediante diversos ensayos descritos en los Ejemplos. Entre las actividades biológicas pueden incluirse, por ejemplo, la inducción de la proliferación de las células T, la inducción de la señalización en las células T, la inducción de la expresión de los marcadores de activación en las células T, la inducción de la secreción de citoquinas por las células T, la inducción de la lisis de células diana tales como células tumorales, y la inducción de la regresión tumoral y/o la mejora de la supervivencia.

Composiciones, formulaciones y vías de administración

En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T proporcionadas en la presente memoria, por ejemplo para la utilización en cualquiera de los métodos terapéuticos posteriores. En una realización, una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T proporcionadas en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T proporcionadas en la presente memoria y por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo tal como se indica posteriormente.

Se proporciona además un método para producir una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención en una forma adecuada para la administración in vivo, comprendiendo el método: (a) obtener una molécula biespecífica de

unión a antígeno activadora de células T según la invención, y (b) formular la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T con por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable, en la que una preparación de molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T se formula para la administración in vivo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T disueltas o dispersadas en un portador farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son generalmente no tóxicas para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas, es decir, no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción no deseada al administrarlas en un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según resulte apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene por lo menos una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T y opcionalmente un ingrediente activo adicional será conocida por el experto en la materia a la luz de la presente exposición, tal como ejemplifica Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a ed., Mack Printing Company, 1990, incorporada en la presente memoria como referencia. Además, para la administración animal (por ejemplo humana), se entenderá que las preparaciones deberían cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la oficina de estándares biológicos de la FDA o autoridades correspondientes en otros países.

Las composiciones preferentes son las formulaciones liofilizadas o las soluciones acuosas. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, surfactantes, antioxidantes, conservantes (por ejemplo agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retardo de la absorción, sales, conservantes, antioxidantes, proteínas, fármacos, estabilizadores de fármaco, polímeros, geles, ligantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, pigmentos, y materiales similares y combinaciones de los mismos, tal como sería conocido por el experto ordinario en la materia (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a ed., Mack Printing Company, 1990, páginas 1289 a 1329, incorporada en la presente memoria como referencia). Excepto en la medida en que cualquier portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se encuentra contemplada la utilización en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

La composición puede comprender diferentes tipos de portadores dependiendo de si debe administrarse en forma sólida, líquida o de aerosol, y de si necesita ser estéril para dichas vías de administración como inyección. Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la presente invención (y cualquier agente terapéutico adicional) pueden administrarse por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intraesplénica, intrarrenal, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítreo, intravaginal, intrarrectal, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosal, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, mediante inhalación (por ejemplo inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada de baño directo de las células diana, mediante un catéter, mediante un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo liposomas) o mediante otro método o cualquier combinación de los anteriores tal como sería conocido por el experto ordinario en la materia (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a ed., Mack Printing Company, 1990, incorporada en la presente memoria como referencia). La administración parenteral, en particular la inyección intravenosa, se utiliza más comúnmente para administrar moléculas de polipéptido, tales como las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención.

Entre las composiciones parenterales se incluyen las diseñadas para la administración mediante inyección, por ejemplo la inyección subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para la inyección, las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tapones fisiológicamente compatibles, tales como la solución de Hank, la solución de Ringer o el tampón de solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, de estabilización y/o de dispersión. Alternativamente, las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T pueden encontrarse en forma de polvos para la reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril libre de pirógenos, antes de la utilización. Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención en la cantidad requerida en el solvente apropiado con diversos otros ingredientes indicados posteriormente, tal como se requiere. La esterilidad puede alcanzarse fácilmente mediante, por ejemplo, filtración a través de membranas de filtración estéril. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los demás ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsión estériles inyectables,

los métodos preferentes de preparación son las técnicas de secado al vacío o de liofilización, que rinden unos polvos del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de medio líquido previamente filtrado a esterilidad del mismo. El medio líquido debe tamponarse convenientemente en caso necesario y el diluyente líquido en primer lugar isotonizarse antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. La composición debe ser estable bajo las condiciones de preparación y almacenamiento, y conservarse frente a la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas debe mantenerse como mínimo a un nivel seguro, por ejemplo menos de 0,5 ng/mg de proteína. Entre los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen, aunque sin limitación: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamónico, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenes tales como metilparabén o propilparabén; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptido de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o surfactantes no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener compuestos que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, la suspensión puede contener además estabilizadores o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos a fin de permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Además, pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos en forma de suspensiones para inyección aceitosas apropiadas. Entre los solventes o vehículos lipofílicos adecuados se incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácido graso sintético, tales como "cleats" de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Los ingredientes activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas mediante, por ejemplo, técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración coloidal de fármacos (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical

Sciences (18a edición, Mack Printing Company, 1990). Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el polipéptido, encontrándose las matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. En realizaciones particulares, puede conseguirse la absorción prolongada de una composición inyectable mediante la utilización en las composiciones de agentes que retardan la absorción, tal como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

Además de las composiciones descritas anteriormente, las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T pueden formularse en forma de una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. De esta manera, por ejemplo las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo como sal poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención pueden prepararse mediante procedimientos de mezcla convencional, disolución, emulsificación, encapsulado, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional utilizando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de las proteínas en preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. La formulación correcta es dependiente de la vía de administración seleccionada.

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T pueden formularse en una composición en un ácido o base libre, en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que conservan sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Entre ellas se incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo las formadas con los grupos amino libres de una composición proteica, o que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como los ácidos acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales

farmacéuticas tienden a ser más solubles en solventes acuosos y otros solventes próticos que las formas de base libres correspondientes.

Métodos y composiciones terapéuticos

En los métodos terapéuticos pueden utilizarse cualesquiera de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T. Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de las células T de la invención pueden utilizarse como agentes inmunoterapéuticos, por ejemplo en el tratamiento de los cánceres.

Para la utilización en los métodos terapéuticos, las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención pueden formularse, dosificarse y administrarse de un modo consistente con la buena práctica médica. Entre los factores a considerar en el presente contexto se incluyen el trastorno particular bajo tratamiento, el mamífero particular bajo tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por el profesional médico.

En un aspecto se proporcionan las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención para la utilización como medicamento. En aspectos adicionales, las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención para la utilización en el tratamiento de una enfermedad. En determinadas realizaciones, se proporcionan las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención para la utilización en un método de tratamiento. En una realización, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T tal como se describe en la presente memoria para la utilización en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que la requiere. En determinadas realizaciones, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T para la utilización en un método de tratamiento de un individuo que presenta una enfermedad que comprende administrar en el individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T. En determinadas realizaciones, la enfermedad que debe tratarse es un trastorno proliferativo. En una realización particular la enfermedad es el cáncer. En determinadas realizaciones el método comprende además administrar en el individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo un agente anticáncer en el caso de que la enfermedad que deba tratarse sea el cáncer. En realizaciones adicionales, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T tal como se describe en la presente memoria para la utilización en la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral. En

determinadas realizaciones, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T para la utilización en un método de inducción de lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar en el individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T para la inducción de la lisis de una célula diana. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas es un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona la utilización de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento está destinado al tratamiento de una enfermedad en un individuo que requiere del mismo. En una realización adicional, el medicamento está destinado a la utilización en un método de tratamiento de una enfermedad, que comprende administrar en un individuo que presenta la enfermedad, una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En determinadas realizaciones, la enfermedad que debe tratarse es un trastorno proliferativo. En una realización particular la enfermedad es el cáncer. En una realización, el método comprende además administrar en el individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo un agente anticáncer en el caso de que la enfermedad que deba tratarse sea el cáncer. En una realización adicional, el medicamento está destinado a la inducción de la lisis de una célula diana, particularmente de una célula tumoral. En una realización todavía adicional, el medicamento está destinado a la utilización en un método de inducción de lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, en un individuo, que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz del medicamento destinado a la inducción de la lisis de una célula diana. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad. En una realización, el método comprende administrar en un individuo que presenta dicha enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención. En una realización, se administra una composición en dicho individuo, comprendiendo la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la enfermedad que debe tratarse es un trastorno proliferativo. En una realización particular la enfermedad es el cáncer. En determinadas realizaciones el método comprende además administrar en el individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de por lo menos un agente terapéutico

adicional, por ejemplo un agente anticáncer en el caso de que la enfermedad que deba tratarse sea el cáncer. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método destinado a la inducción de la lisis de una célula diana, particularmente de una célula tumoral. En una realización, el método comprende poner en contacto una célula diana con una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención en presencia de una célula T, particularmente una célula T citotóxica. En un aspecto adicional, se proporciona un método destinado a la inducción de la lisis de una célula diana, particularmente de una célula tumoral, en un individuo. En una de dichas realizaciones, el método comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención a fin de inducir la lisis de una célula diana. En una realización, un "individuo" es un ser humano.

En determinadas realizaciones, la enfermedad que debe tratarse es un trastorno proliferativo, particularmente el cáncer. Entre los ejemplos no limitativos de cáncer se incluyen cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de sangre, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, cáncer de hueso y cáncer de riñón. Entre otros trastornos de la proliferación celular que pueden tratarse utilizando una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, neoplasmas localizados en: abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (adrenal, paratiroidea, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroidea), ojos, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejidos blandos, bazo, región torácica y sistema urogenital. También se encuentran incluidas las condiciones o lesiones precancerosas y las metástasis del cáncer. En determinadas realizaciones el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer de células renales, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer ovárico. En una realización, la célula es un tumor sólido. El experto en la materia reconocerá que en muchos casos la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T puede no proporcionar una curación sino sólo proporcionar un beneficio parcial. En algunas realizaciones, un cambio fisiológico que presenta cierto beneficio también se considera terapéuticamente beneficiosa. De esta manera, en algunas realizaciones, una cantidad de molécula biespecífica de unión a

antígeno activadora de células T que proporciona un cambio fisiológico se considera una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz". El sujeto, paciente o individuo que requiere tratamiento típicamente es un mamífero, más concretamente un ser humano. En algunas realizaciones, se administra en la célula una cantidad eficaz de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T. En otras realizaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención en un individuo para el tratamiento de una enfermedad.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención (utilizada sola o en combinación con otro u otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá de: el tipo de enfermedad que debe tratarse, la vía de administración, el peso corporal del paciente, el tipo de molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, la severidad y el curso de la enfermedad, si la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T se ha administrado con fines preventivos o terapéuticos, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, la historia clínica del paciente y la respuesta a la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, y el criterio del médico responsable. El profesional sanitario responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de ingrediente o ingredientes activos en una composición y una o más dosis apropiadas para el sujeto individual. Se encuentran contempladas dentro de la presente memoria diversos programas de dosificación, aunque sin limitación, las administraciones individuales o múltiples en diversos puntos del tiempo, la administración de bolo y la infusión de pulsos.

La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T se administra convenientemente en el paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosis candidata inicial de molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T puede ser de entre aproximadamente 1 µg/kg y 15 mg/kg (por ejemplo de entre 0,1 mg/kg y 10 mg/kg) para la administración en el paciente mediante, por ejemplo, una o más administraciones separadas o mediante la infusión continua. Una dosis diaria típica puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento generalmente se mantendría hasta producirse una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T se encontraría comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,005 mg/kg y

aproximadamente 10 mg/kg. En otros ejemplos no limitativos, una dosis puede comprender además entre aproximadamente 1 microgramo/kg de peso corporal, 5 microgramos/kg de peso corporal, 10 microgramos/kg de peso corporal, 50 microgramos/kg de peso corporal, 100 microgramos/kg de peso corporal, 200 microgramos/kg de peso corporal, 350 microgramos/kg de peso corporal, 500 microgramos/kg de peso corporal, 1 miligramo/kg de peso corporal, 5 miligramos/kg de peso corporal, 10 miligramos/kg de peso corporal, 50 miligramos/kg de peso corporal, 100 miligramos/kg de peso corporal, 200 miligramos/kg de peso corporal, 350 miligramos/kg de peso corporal, 500 miligramos/kg de peso corporal y aproximadamente 1.000 microgramo/kg de peso corporal o más por cada administración, y cualquier intervalo derivable de los mismos. En ejemplos no limitativos de un intervalo derivable de los números listados en la presente memoria, puede administrarse un intervalo de entre aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, entre aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal y aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc., basado en los números indicados anteriormente.

De esta manera, pueden administrarse en el paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg ó 10 mg/kg (o cualquier combinación de los mismos). Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de manera que el paciente reciba entre aproximadamente dos y aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T). Puede administrarse una dosis de carga más alta inicial, seguido de una o más dosis inferiores. Sin embargo, pueden resultar útiles otros regímenes de dosificación. Se realiza fácilmente un seguimiento del avance de dicha terapia utilizando técnicas y ensayos convencionales.

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención generalmente se utilizan en una cantidad eficaz para conseguir el propósito deseado. Para la utilización en el tratamiento o la prevención de una condición de enfermedad, las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T, o composiciones farmacéuticas de las mismas, se administran o se aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra perfectamente dentro de las capacidades del experto en la materia, especialmente a la luz de la exposición detallada proporcionada en la presente memoria.

Para la administración sistémica, una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos in vitro, tales como ensayos de cultivo celular. A continuación, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un

intervalo de concentraciones circulantes que incluye la IC_{50} determinada en cultivo celular. Dicha información puede utilizarse más exactamente para determinar dosis útiles en el ser humano.

Las dosis iniciales también pueden estimarse a partir de datos in vivo, por ejemplo modelos animales, utilizando técnicas que son bien conocidas de la técnica. El experto ordinario en la materia podría optimizar fácilmente la administración en el ser humano basándose en datos animales.

La cantidad de dosis e intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T que son suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosis habituales de los pacientes para la administración mediante inyección se encuentran comprendidas en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 50 mg/kg/día, típicamente de entre aproximadamente 0,5 y 1 mg/kg/día. Los niveles plasmáticos terapéuticamente eficaces pueden alcanzarse mediante la administración de múltiples dosis cada día. Los niveles en plasma pueden medirse mediante, por ejemplo, HPLC.

En casos de administración local o incorporación selectiva, la concentración local eficaz de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T puede no estar relacionada con la concentración plasmática. El experto en la materia podrá optimizar las dosis locales terapéuticamente eficaces sin necesidad de experimentación indebida.

Una dosis terapéuticamente eficaz de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T indicadas en la presente memoria generalmente proporcionará un beneficio terapéutico sin provocar toxicidad sustancial. La toxicidad y la eficacia terapéutica de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivo celular o en animales experimentales. Los ensayos de cultivo celular y los estudios animales pueden utilizarse para determinar la LD_{50} (dosis letal para el 50% de una población) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de una población). La proporción de dosis entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico, que puede expresarse como la proporción LD_{50}/ED_{50} . Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T que muestran índices terapéuticos elevados resultan preferentes. En una realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la invención muestra un índice terapéutico elevado. Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden utilizarse para formular un intervalo de dosis adecuado para la utilización en el ser humano. La dosis se encuentra

preferentemente comprendida en el intervalo de concentraciones circulantes que incluye la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de dicho intervalo dependiendo de una diversidad de factores, por ejemplo la forma de administración utilizada, la vía de administración utilizada, la condición del sujeto y similares. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis pueden ser seleccionadas por el médico individual en vista de la condición del paciente (ver, por ejemplo, Fingl et al., en: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, cap. 1, p. 1, 1975, incorporada en la presente memoria como referencia en su totalidad).

El médico responsable de los pacientes tratados con las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención conocerá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad, disfunción orgánica y similar. A la inversa, el médico responsable también conocerá cómo ajustar el tratamiento a niveles más altos en el caso de que la respuesta clínica no sea adecuada (excluyendo toxicidad).

La magnitud de una dosis administrada en el control del trastorno de interés variará según la gravedad de la condición que debe tratarse, la vía de administración y similares. La gravedad de la condición puede evaluarse, por ejemplo, en parte, mediante métodos de evaluación pronóstica estándares. Además, la dosis y quizá la frecuencia de dosificación también variarán según la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual.

Otros agentes y tratamientos

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención pueden administrarse en combinación con otro u otros agentes en la terapia. Por ejemplo, una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención puede coadministrarse con por lo menos un agente terapéutico adicional. La expresión "agente terapéutico" comprende cualquier agente administrado para tratar un síntoma o enfermedad en un individuo que requiere dicho tratamiento. Dicho agente terapéutico adicional puede comprender cualesquiera ingredientes activos adecuados para la indicación particular bajo tratamiento, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no presente efectos mutuos adversos. En determinadas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un agente inmunomodulador, un agente citostático, un inhibidor de la adhesión celular, un agente citotóxico, un activador de la apoptosis celular o un agente que incrementa la sensibilidad de las células frente a inductores apoptóticos. En una realización particular, el agente terapéutico adicional es un agente anticáncer, por ejemplo un disruptor de los microtúbulos, un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasa, un intercalante del ADN, un agente alquilante, una terapia

hormonal, un inhibidor de quinasa, un antagonista de receptor, un activador de la apoptosis de las células tumorales o un agente antiangiogénico.

Dichos otros agentes se encuentran presentes convenientemente en combinación en cantidades que resultan eficaces para el propósito pretendido. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T utilizada, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores comentados anteriormente. Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T se utilizan generalmente a las mismas dosis y por vías de administración tales como las indicadas en la presente memoria, o entre aproximadamente 1% y 99% de las dosis indicadas en la presente memoria, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que resulta apropiada.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente comprenden la administración combinada (en la que se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso, la administración de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención puede realizarse antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de células T de la invención también puede utilizarse en combinación con terapia de radiación.

Artículos fabricados

En otro aspecto de la invención se proporciona un artículo fabricado que contiene materiales que resultan útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos indicados anteriormente. El artículo fabricado comprende un recipiente y una etiqueta o impreso en el paquete o asociado al recipiente. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que resulta, por sí misma o en combinación con otra composición, efectiva para tratar, prevenir y/o diagnosticar la condición y que puede presentar una abertura de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que presenta un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención. La etiqueta o impreso en el paquete indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la condición de elección. Además, el artículo fabricado puede comprender: (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el

que la composición comprende una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T de la invención, y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente adicional citotóxico o de otro modo terapéutico. El artículo fabricado en la presente realización de la invención puede comprender además un impreso en el paquete que indique que las composiciones pueden utilizarse para tratar una condición particular. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo fabricado puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Ejemplos

A continuación se proporcionan ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Métodos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se utilizaron métodos estándares para manipular el ADN, tales como los descritos en Sambrook, J. et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Se proporciona información general sobre secuencias de nucleótidos de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas humanas en: Kabat E.A. *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edición, NIH publicación nº 91-3242.

Secuenciación de ADN

Se determinaron las secuencias del ADN mediante secuenciación de doble cadena.

Síntesis génica

Los segmentos génicos deseados en donde se requerían se generaron mediante PCR utilizando moldes apropiados o fueron sintetizados por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR mediante síntesis génica automática. En el caso de que no se dispusiese de una secuencia génica exacta, se diseñaron cebadores oligonucleótidos basándose en las secuencias de los homólogos

más próximos y los genes se aislaron mediante RT-PCR a partir de ARN originado en el tejido apropiado. Los segmentos génicos flanqueados por sitios únicos de corte por endonucleasa de restricción se clonaron en vectores de clonación/secuenciación estándares. El plásmido de ADN se purificó a partir de bacterias transformadas y la concentración se determinó mediante espectroscopía de UV. La secuencia del ADN de los fragmentos génicos subclonados se confirmó mediante secuenciación de ADN. Se diseñaron segmentos génicos con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los vectores de expresión respectivos. Todos los constructos se diseñaron con una secuencia 5'-terminal de ADN codificante de un péptido líder que presenta como diana proteínas para la secreción en células eucarióticas.

Ejemplo 1

Unión de diferentes variantes humanizadas de IgG T84.66 a células

Se desarrollaron nuevas variantes humanizadas del anticuerpo murino T84.66 (Wagener et al., J. Immunol. 130:2308, 1983; Neumaier et al., J. Immunol. 135:3604, 1985) mediante injertación de las CDR en secuencias aceptoras de marco de línea germinal humana.

En el presente ejemplo, se sometió a ensayo la unión de diferentes variantes humanizadas de la IgG T84.66 en células de adenocarcinoma gástrico humano expresantes de ACE (MKN45, DSMZ nº ACC 409).

Brevemente, las células se recolectaron, se contaron y se comprobó su viabilidad y se resuspendieron 2×10^6 células/ml en tampón de FACS (100 μ l de PBS con BSA al 0,1%). Se incubaron 100 μ l de suspensión celular (que contenía $0,2 \times 10^6$ células) en placa de fondo redondo de 96 pocillos durante 30 min. a 4°C con concentraciones crecientes de la Ig del ACE (4 ng/ml - 60 μ g/ml), se lavaron dos veces con PBS frío con BSA al 0,1%, se reincubaron durante 30 min. adicionales a 4°C con anticuerpo secundario F(ab')₂ específico de fragmento Fc γ de cabra anti-IgG humano AffiniPure conjugado con PE (Jackson Immuno Research Lab PE nº 109-116-170), se lavó dos veces con PBS frío con BSA al 0,1% y se analizó mediante FACS utilizando un aparato FACS Cantoll (Software FACS Diva). Se obtuvieron curvas de unión y valores de EC₅₀ y se calcularon utilizando GraphPadPrism5 (figura 2, unión a células MKN45).

La figura 2 muestra el diferente patrón de unión de variantes humanizadas seleccionadas de la IgG T84.66 del ACE humano, expresadas sobre células MKN45. Basándose en los patrones de unión y los valores de unión EC₅₀ calculados (Tabla 1), se seleccionó la variante humanizada 1 (SEC ID nº 22 y nº 23) para la evaluación posterior.

TABLA 1. Unión de dferentes variantes humanizadas de IgG T84.66 a las células (valores de EC₅₀, basados en las curvas de unión mostradas en la figura 2, calculados con Graph Pad Prism).

	EC ₅₀ (µg/ml)
T84.66 quimérico parental	0,99
Variante humanizada 1	1,5
Variante humanizada 2	8,6
Variante humanizada 3	1,4
Variante humanizada 4	3,1
Variante humanizada 5	-
Variante humanizada 6	-

Ejemplo 2

Preparación de moléculas biespecíficas de células T (CTB) anti-ACE/anti-CD3

Se prepararon las moléculas siguientes en el presente ejemplo; se muestran ilustraciones esquemáticas de las mismas en la figura 3:

- A. “2+1 IgG CrossFab, invertido” con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en ligante de CD3, modificación de carga en ligantes de ACE; ligante de ACE murino parental (T84.66)) (figura 3A, SEC ID nº 32-35)
- B. “2+1 IgG CrossFab, invertido” con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en ligante de CD3, modificación de carga en ligante de ACE, ligante de ACE alternativo) (figura 3B, SEC ID nº 34, 36-38)
- C. “1+1 IgG CrossFab, invertido” con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en ligante de CD3, modificación de carga en ligante de ACE, ligante de ACE humanizado) (figura 3C, SEC ID nº 34, 37-39)
- D. “1+1 IgG CrossMab” con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en ligante de CD3, modificación de carga en ligante de ACE, ligante de ACE humanizado) (figura 3D, SEC ID nº 34, 36, 38, 40)
- E. “2+1 IgG CrossFab, invertido” con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en ligante de CD3, modificación de carga en ligante de ACE, ligante de ACE alternativo, conector más largo) (figura 3E, SEC ID nº 34, 36, 38, 41).
- F. “2+1 IgG CrossFab, invertido” sin modificaciones de carga (intercambio VH/VL en ligante de CD3, ligante de ACE humanizado) (figura 3F, SEC ID nº 34, 50-52).

Las secuencias de ADN codificantes de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los ligantes de CD3 y de ACE se subclonaron en el mismo marco con las regiones constantes respectivas que se encuentran preinsertadas en el vector de

expresión de mamífero receptor respectivo. La expresión de las proteínas está controlada por un promotor de MPSV o de CMV. La poliadenilación está controlada por una secuencia de señal poliA sintética situada en el extremo 3' del CDS. Además, cada vector contenía una secuencia OriP del VEB para la replicación autosómica.

Para la producción de las moléculas, se cotransfectaron células HEK293-EBNA cultivadas en suspensión con los vectores de expresión respectivos utilizando polietilenimina (PEI) como reactivo de transfección. Las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes en una proporción 1:2:1:1 (A, B, E y F: "vector cadena pesada (VH-CH1-VL-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VL-CL)": "vector cadena pesada (VH-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VH-CL)") o una proporción 1:1:1:1 (C: "vector cadena pesada (VH-CH1-VL-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VL-CL)": "vector cadena pesada (CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VH-CL)", D: "vector cadena pesada (VL-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VL-CL)": "vector cadena pesada (VH-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VH-CL)").

Para la transfección, se cultivaron células HEK293 EBNA en suspensión sin suero en medio de cultivo Excell que contenía L-glutamina 6 mM y G418 250 mg/l. Para la producción en matraces TubeSpin de 600 ml (volumen de trabajo max.: 400 ml) se sembraron 600 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 min. a 210xg y el sobrenadante se sustituyó por 20 ml de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 400 µg de ADN. Tras la adición de 1.080 µl de solución de PEI (2,7 µg/ml), la mezcla se agitó con vórtex durante 15 s y después se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente. A continuación, las células se mezclaron con la solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz TubeSpin de 600 ml y se incubaron durante 3 horas a 37°C en un incubador con una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Tras la incubación, se añadieron 360 ml de medio Excell, que contenía L-glutamina 6 mM, 5 g/l de Pepsoy + medio VPA 1,0 mM y las células se cultivaron durante 24 horas. Un día después de la transfección se añadió Feed 1 al 7%. Tras 7 días de cultivo, se recogió el sobrenadante para la purificación mediante centrifugación durante 20 a 30 min. a 3.600xg (centrífuga Sigma 8K), la solución se filtró a esterilidad (filtro de 0,22 µm) y se añadió azida sódica a una concentración final de 0,01% p/v. La solución se mantuvo a 4°C.

El título de las moléculas en el medio de cultivo se determinó mediante HPLC-proteína A (Tabla 2). El cálculo del título se basa en un procedimiento en dos etapas e incluye la unión de moléculas que contienen Fc a proteína A a pH 8,0 y la liberación en una etapa de

elución a pH 2,5. Ambos tampones utilizados para el análisis contenían Tris (10 mM), glicina (50 mM) y NaCl (100 mM) y se ajustaron a los pH respectivos (8 y 2,5). El cuerpo de la columna era una precolumna Upchurch de 2x20 mm con un volumen interno de ~63 µl empaquetada con POROS 20A. Tras la calibración inicial, se inyectaron 100 µl de cada muestra a un caudal de 0,5 ml/min. Tras 0,67 minutos, la muestra se eluyó con un escalonado del pH hasta pH 2,5. La cuantificación se llevó a cabo mediante determinación de la absorbancia a 280 nm y cálculo utilizando una curva de estándares con un intervalo de concentraciones de IgG humana de 16 a 166 mg/l.

Las proteínas secretadas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad utilizando cromatografía de afinidad de proteína A, seguido de una etapa cromatográfica de exclusión por tamaño.

Para la cromatografía de afinidad el sobrenadante se cargó en una columna HP HiTrap de proteína A (moléculas A, B y F) o en una columna MabSelectSure (moléculas C, D y E) (VC=5 ML, GE Healthcare) equilibradas con 25 ml de fosfato sódico 20 mM y citrato sódico 20 mM, pH 7,5. La proteína no unida se eliminó mediante lavado con por lo menos 10 volúmenes de columna de fosfato sódico 20 mM, citrato sódico 20 mM, pH 7,5 y la proteína diana se eluyó en 6 volúmenes de columna de citrato sódico 20 mM, cloruro sódico 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0. La solución de proteínas se neutralizó mediante la adición de 1/10 de fosfato sódico 0,5 M, pH 8,0. Para el análisis del proceso tras la cromatografía de proteína A, la pureza y el peso molecular de las moléculas en las fracciones individuales se analizaron mediante SDS-PAGE en ausencia de un agente reductor y tinción de Coomassie (InstantBlue™, Expedeon). Se utilizó el sistema de gel Premoldeado NuPAGE® (Bis-Tris al 4-12%, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se concentraron y filtraron fracciones seleccionadas de la proteína diana antes de cargarlas en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro sódico 140 mM, Tween-20 al 0,01%, pH 6,0.

La concentración de proteínas de las muestras de proteínas purificadas se determinó mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos.

Se analizó el contenido de agregados de las moléculas utilizando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) en tampón de migración de K₂HPO₄ 25 mM, NaCl 125 mM, monohidrocloreuro de L-arginina 200 mM, NaN₃ al 0,02 % (p/v), pH 6,7, a 25°C.

La pureza y peso molecular de las moléculas tras la etapa final de purificación se analizaron mediante análisis de CE-SDS en presencia y en ausencia de un agente reductor. Se utilizó el sistema Caliper Labchip GXII (Caliper Lifescience) siguiendo las instrucciones del fabricante (figura 5 y Tabla 3).

Se llevó a cabo el análisis de espectrometría de masas en un sistema de CL-EM Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). El sistema de cromatografía (Agilent 1260 Infinity) se acopló a un dispositivo de CL/EM IEP Agilent 6224 TOF. Se inyectaron aproximadamente 5 µg de muestra en una columna Nucleogel RP1000-8 de 250 mm x 4,6 mm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Alemania) a un caudal de 1 ml/min. a 40°C. La fase móvil era la siguiente A: 5% de acetonitrilo, ácido fórmico al 0,05%, y B: 95% de acetonitrilo y ácido fórmico al 0,05%. Para aplicar un gradiente de elución, se elevó el 15% de B a 60% de B en 10 min., y después hasta 100% de B en 2,5 min.

El espectrómetro de masas medía en modo de alta resolución a 4 GHz positivo y realizó registros en el intervalo de 500 a 3.200 m/z. Los espectros de m/z se desconvolucionaron manualmente con el MassAnalyzer 2.4.1 de Roche (Hoffman-La Roche, Ltd.).

Se produjeron y purificaron todas las moléculas siguiendo el mismo método. La calidad final de la molécula era muy buena para ambas moléculas, A y B, con un contenido de monómero de prácticamente 100% y una pureza de 100% en la EC-SDS (Tablas 2 y 3, figura 4). El análisis de CL-EM se llevó a cabo para la molécula B y no reveló apareamiento incorrecto de las cadenas ligeras. En contraste, la molécula F (sin modificaciones de la carga) presentó una recuperación muy baja porque resultó necesario eliminar los productos secundarios, y las mediciones de CL-EM todavía mostraban un apareamiento incorrecto de aproximadamente 10%. La molécula C pudo purificarse con un rendimiento y calidad ligeramente mejores que la molécula D. La calidad final también era buena para ambas moléculas, C y D, con un contenido de monómero de prácticamente 100% y >96% de pureza en la EC-SDS (Tablas 2 y 3, figura 4).

TABLA 2. Resumen de la producción y purificación de las moléculas de CTB anti-ACE/anti-CD3 con y sin modificaciones de carga.

Molécula	Título [mg/l]	Recuperación [%]	Rendimiento [mg/l]	CET analítica (PME/monómero/PMB) [%]
A	10	40	4	0/100/0
B	1,5	61	0,9	0,8/99,2/0

C	20	36	7,3	0/100/0
D	10	17	1,7	0/99/1
E	16	27	4,3	3/97/0
F	15	3	0,46	0/100/0

TABLA 3. Análisis de CE-SDS (no reducido) de moléculas de CTB anti-ACE/anti-CD3 con y sin modificaciones de carga.

Molécula	Nº de pico	Tamaño [kDa]	Pureza [%]
A	1	218,6	100
B	1	199,6	100
C	1	169	100
D	1	98	4
	2	166	96
E	1	190	2
	2	200	94
	3	210	4
F	1	172	2
	2	197	2
	3	220	2
	4	230	94

Ejemplo 3

Comparación de moléculas biespecíficas de células T (CTB) anti-ACE/anti-CD3

Ejemplo 3A

Unión de diferentes moléculas biespecíficas de células T (CTB) anti-ACE/anti-CD3 a células

La unión de diferentes formatos de moléculas biespecíficas de células T anti-ACE/anti-CD3 (CTB CD3 ACE) se sometió a ensayo en células de adenocarcinoma gástrico humano (MKN5, DSM nº ACC 409, ~513.000 sitios de unión de ACE), células de adenocarcinoma de colon LS174T, ATCC nº CL-188, ~40.700 sitios de unión de ACE) y células de adenocarcinoma de colon HT29 (DSMZ nº ACC 299, ~10.000 sitios de unión de ACE), así como en células linfocitarias T inmortalizadas expresantes de CD3 (Jurkat, DSMZ nº ACC 282).

Brevemente, las células se recolectaron, se contaron y se comprobó su viabilidad y se resuspendieron 2×10^6 células/ml en tampón de FACS (100 μ l de PBS con BSA al 0,1%). Se incubaron 100 μ l de suspensión celular (que contenía $0,2 \times 10^6$ células) en placa de fondo redondo de 96 pocillos durante 30 min. a 4°C con concentraciones crecientes de las moléculas de CTB CD3 ACE (310 pM a 500 nM), se lavaron dos veces con PBS frío con BSA al 0,1%, se reincubaron durante 30 min. adicionales a 4°C con anticuerpo secundario F(ab')₂ específico de fragmento Fc γ de cabra anti-IgG humano AffiniPure conjugado con fluoresceína (FITC) (Jackson Immuno Research Lab PE n° 109-096-008), se lavó dos veces con PBS frío con BSA al 0,1%.

Se fijó la tinción mediante incubación de las células con tampón de FACS que contenía PFA al 2% durante 30 min. a 4°C en la oscuridad. Para la medición, las células se resuspendieron en 150 μ l de tampón de FACS y se midió la fluorescencia utilizando MACSQuant de Miltenyi.

Los resultados se muestran en la figura 5. Se obtuvieron curvas de unión utilizando GraphPadPrism5 (fila superior, de izquierda a derecha, células MKN45; células LS174T, unión a células HT29; fila inferior, unión a células Jurkat).

La figura 5 muestra las intensidades de fluorescencia más altas para la molécula D y la molécula C a alta concentración en líneas celulares con un nivel de expresión de ACE intermedio (LS174T) o bajo (HT29). Lo anterior apunta al hecho de que una mayor proporción de los constructos de unión monovalente son capaces de unirse bajo dichas condiciones que la molécula B, que se une al ACE humano bivalentemente. La unión a CD3 humano sobre las células Jurkat es comparable para la molécula C y la molécula B, mientras que la molécula D muestra una unión mejor. Lo anterior podría deberse a una mejor accesibilidad de la fracción con diana en CD3 en la molécula D.

Ejemplo 3B

Eliminación de células tumorales inducida por diferentes moléculas biespecíficas de células T anti-ACE/anti-CD3 (CTB CD3 ACE)

La eliminación mediada por células T de diferentes células tumorales por moléculas de CTB CD3 ACE se evaluó utilizando células tumorales MKN45, BxPC-3 (ECACC 93120816, una línea celular de adenocarcinoma pancreático primario humano) o células tumorales humanas HT-29 como dianas y CMSP humanas como células efectoras. La lisis de células tumorales se detectó a las 24 h y 48 h de incubación con las moléculas de CTB CD3 ACE indicadas.

Brevemente, se recolectaron las células diana con tripsina/EDTA, se lavaron y se sembraron en placa a una densidad de 25.000 células/pocillo utilizando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhiriesen durante la noche. Se

prepararon células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante centrifugación de densidad Histopaque de preparaciones de linfocitos enriquecidas de sangre heparinizada (capas leucocitarias) obtenida de donantes humanos sanos. Se diluyó sangre fresca con PBS estéril y se aplicó en capas sobre gradiente Histopaque (Sigma, nº H8889). Tras la centrifugación (450xg, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma en la parte superior de la interfase que contenía las CMSP, se descartó y las CMSP se transfirieron a un nuevo tubo Falcon que posteriormente se rellenó con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400xg, 10 minutos, temperatura ambiente), se descartó el sobrenadante y el pellet de CMSP se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación 350xg, 10 minutos). La población de CMSP resultante se contó automáticamente (ViCell) y se mantuvo en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10% y L-alanil-L-glutamina al 1% (Biochrom, K0302) a 37%, 5% de CO₂ en incubador celular hasta la utilización posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de lisis de células tumorales, se añadieron las moléculas de CTB CD3 ACE a las concentraciones indicadas (intervalo de 1 pM a 20 nM por triplicado). Se añadieron CMSP a las células diana a una proporción E:T final de 10:1. Se evaluó la lisis de células diana tras 24 y 48 h de incubación a 37°C, con 5% de CO₂ mediante cuantificación de la LDH liberada a sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, nº 11 644 793 001). Se alcanzó la lisis máxima de las células diana (=100%) mediante incubación de las células diana con Triton X-100 al 1%. La lisis mínima (=0%) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin constructo biespecífico.

La figura 6 muestra que la molécula D indujo la eliminación más fuerte de líneas celulares diana, seguido de la molécula C y finalmente la molécula B. La mejor diferenciación entre los tres formatos diferentes puede observarse en líneas de células tumorales con niveles bajos de expresión de ACE (figuras 6C y 6F). Se calcularon los valores de EC₅₀ de lisis de células tumorales con Graph Pad Prism5 y se presentan en la Tabla 4 (24 h) y en la Tabla 5 (48 h).

TABLA 4. Valores de EC₅₀ (pM) para la eliminación mediada por células T de células tumorales expresantes de ACE inducidas por diferentes moléculas de CTB CD3 ACE tras 24 h.

Línea celular	Sitios de unión de ACE	Molécula B	Molécula C	Molécula D
MKN45	513.000	78,46	72,96	13,58
BxPC-3	44.400	113,5	91,33	22,19
HT-29	10.000		214,5	142,0

TABLA 5. Valores de EC₅₀ (pM) para la eliminación mediada por células T de células tumorales expresantes de ACE inducidas por diferentes moléculas de CTB CD3 ACE tras 48 h.

Línea celular	Sitios de unión de ACE	Molécula B	Molécula C	Molécula D
MKN45	513. 000	41,24	47,64	11,60
BxPC-3	44. 400	46,98	32,42	13,67
HT-29	10. 000	31,72	63,80	62,44

Ejemplo 3C

Regulación positiva de CD25 en células efectoras CD4⁺ y CD8⁺ tras la eliminación de células tumorales expresantes de ACE inducida por diferentes moléculas de CTB CD3 ACE

La activación de células T CD4⁺ (figura 7 A-D) y CD8⁺ (figura 7 E-H) tras la eliminación de las células tumorales expresantes de ACE MKN45, BxPC3 o HT29 medida por diferentes moléculas de CTB CD3 ACE se evaluó mediante análisis de FACS utilizando anticuerpos que reconocían el marcador de activación de células T CD25 (marcador de activación tardía). Además, se analizó CD25 sobre células T efectoras CD4 y CD8 tras la coincubación de las células efectoras con diferentes moléculas de CTB CD3 ACE en ausencia de células diana para comprobar la activación de las células T no específica de antígeno.

El anticuerpo y las condiciones del ensayo de eliminación fueron esencialmente las indicadas anteriormente (Ejemplo 3B), utilizando el mismo intervalo de concentraciones de anticuerpo (1 pM a 20 nM, por triplicado), proporción E:T de 10:1 y un tiempo de incubación de 48 h.

Tras la incubación, se transfirieron las CMSP a una placa de fondo redondo de 96 pocillos, se centrifugaron a 350xg durante 5 min. y se lavaron dos veces con PBS que contenía BSA al 0,1%. Se llevó a cabo la tinción superficial de CD8 (FITC anti-CD8 humano, Biolegend nº 344704), CD4 (PECy7 anti-CD4 humano, Biolegend nº 344612) y CD25 (APC anti-CD25 humano, Biolegend nº 302610) siguiendo las indicaciones del proveedor. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1% y se fijaron durante 30 min. a 4°C utilizando 150 µl/pocillo de tampón de FACS que contenía

PFA al 2%. Tras la centrifugación, las muestras se resuspendieron en 200 µl/pocillo de PBS con BSA al 0,1% y se analizaron utilizando un BD FACS Fortessa.

La figura 7 muestra que la molécula D indujo la activación más fuerte de las células T, medida como porcentaje de células T positivas para CD25. Sin embargo, dicha molécula también indujo la activación de las células T en ausencia de células diana a las 2-3 concentraciones más altas y, por lo tanto, no se seleccionó como el formato preferente.

La molécula C era la segunda molécula más potente en la inducción de la activación de las células T en presencia de células diana expresantes de ACE, lo que resulta especialmente evidente en contextos con células diana que expresan niveles bastantes bajos de ACE (figura 7C). También la molécula B era capaz de inducir una activación fuerte y dependiente de la concentración de las células T en presencia de células diana expresantes de ACE. En el presente ejemplo, ambas moléculas, B y C, no indujeron una activación significativa de las células T en ausencia de células diana.

Para estudiar adicionalmente dicho importante punto de seguridad, se llevaron a cabo ensayos adicionales.

Ejemplo 3D

Regulación positiva de CD69 en células efectoras CD4⁺ y CD8⁺ tras la coincubación con diferentes moléculas de CTB CD3 ACE y tumorales o epiteliales primarias expresantes de ACE

Se evaluó la activación de las células T CD4⁺ (figura 8 A-E) y CD8⁺ (figura 8 F-J) tras la coincubación de las células expresantes de ACE MKN45, LS174T (ECACC 87060401, una línea celular de adenocarcinoma de colon humano con aproximadamente 40.700 sitios de unión de ACE), HT29 o CCD 841 CoN (ATCC nº CRL-1790TM, una línea celular epitelial primaria del colon humano, que expresa <2.000 sitios de unión a ACE) con CMSP humana y diferentes moléculas de CTB CD3 ACE durante 48 h. Para comprobar la activación de las células T no específica de antígeno, se analizó CD69 sobre las células T efectoras CD4 y CD8 tras la coincubación de las células efectoras con las diferentes moléculas de CBT CD3 ACE en ausencia de células diana también.

El anticuerpo y las condiciones del ensayo fueron esencialmente las indicadas anteriormente (Ejemplos 3B y 3C), utilizando el mismo intervalo de concentraciones de anticuerpo (1 pM a 20 nM, por triplicado) y una proporción E:T de 10:1, así como el protocolo de tinción de FACS indicado anteriormente (PE anti-CD69 humano, BioLegend nº 310906).

La figura 8 muestra nuevamente que la molécula D indujo la activación más fuerte de las células T, medida como porcentaje de células T positivas para CD69 en presencia de diferentes células tumorales expresantes de ACE. Sin embargo, dicha molécula también indujo la activación de las células T en presencia de células epiteliales primarias (CCD841, ver las figuras 8D y 8I), así como en ausencia de células diana (figuras 8E y 8J). Estos resultados confirman la activación de las células T independiente de antígeno y además apuntan a un potencial problema de seguridad en presencia de células epiteliales primarias con niveles de expresión de ACE muy bajos.

Sin embargo, con dichas células CMSP efectoras reactivas, se observó la activación de células T independiente de antígeno con la segunda molécula más potente también, la molécula C. En consecuencia, el único formato que mostró una eliminación fuerte y dependiente de la concentración de las diversas células tumorales expresantes de ACE, pero ninguna eliminación significativa de células epiteliales primarias, ni activación de células T independiente de antígeno en presencia de células epiteliales primarias o en ausencia de células diana fue la molécula B. Por lo tanto, se seleccionó el formato de "2+1 IgG CrossFab, invertido" como el formato preferente.

Ejemplo 4

Comparación de moléculas biespecíficas anti-ACE / anti-CD3 que comprenden ligantes de ACE parentales o humanizados

Ejemplo 4A

Activación de células T y eliminación de células tumorales inducida por diferentes moléculas de CBT CD3 ACE (T84.66 quimérico frente a variante humanizada 1)

Se evaluó el impacto del ligante de ACE (T84.66 quimérico parental frente a variante humanizada 1) sobre la potencial final de las CBT CD3 ACE de inducir la activación de las células T o la lisis de las células tumorales, utilizando un ensayo clásico de lisis de células tumorales con la posterior tinción de los marcadores de activación de las células T tal como se ha indicado anteriormente (Ejemplos 3B y 3C). Con el fin de evaluar adicionalmente la ventana de seguridad, también se coincubaron ambas moléculas con células efectoras solo.

Brevemente, las células diana incluidas en el presente ensayo eran células MKN45 y CCD841 CoN. Las moléculas de CTB CD3 ACE A y B se añadieron en el intervalo de concentraciones indicado de 1 pM a 20 nM (por triplicado). Se añadieron CMSP a las células diana a una proporción E:T final de 10:1. Se detectó la lisis de las células

tumorales o epiteliales primarias a las 48 h de incubación con las moléculas de CBT CD3 ACE indicadas. Se recolectaron las CMSP de dicho ensayo se tiñeron para CD8⁺ y el marcador de activación temprana CD69 tal como se ha indicado anteriormente (Ejemplo 3C).

La figura 9 muestra que la molécula de CBT CD3 ACE que contenía el ligante de ACE T84.66 quimérico parental (molécula A) indujo tanto la activación de las células T (figura 9 A, B) como la lisis celular (figura 9C, D) no sólo en presencia de células tumorales de alto nivel de expresión de ACE (MKN45), sino también en presencia de las células epiteliales primarias CCD841 con niveles muy bajos de expresión de ACE o en ausencia de células diana.

En contraste, la molécula de CBT CD3 ACE que contenía el ligante humanizado (molécula B) indujo la activación de las células T sólo en presencia de la línea de células tumorales MKN45 pero no en presencia de la línea de células epiteliales primarias. Lo mismo es cierto para la lisis celular. Además, no se observó una activación significativa de las células T en ausencia de células diana.

Ejemplo 4B

Con el fin de evaluar adicionalmente la ventana de seguridad de las moléculas de CBT CD3 ACE que contenían el ligante de ACE T84.66 quimérico parental (molécula A) o la variante humanizada 1 (molécula B), se llevó a cabo un ensayo sensible de informador Jurkat-NFAT. En principio, la unión simultánea de la molécula CTB a ACE humano sobre las células expresantes de antígeno y a CD3 humano sobre células informadoras Jurkat-NFAT (una línea celular informadora de leucemia linfática aguda humana con una expresión de luciferasa regulada por promotor de NFAT, GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega nº CS176501), activa el promotor NFAT y conduce a la expresión de luciferasa de luciérnaga activa. La intensidad de la señal de luminiscencia (obtenida con la adición de sustrato de luciferasa) es proporcional a la intensidad de la activación y señalización de CD3.

Para el ensayo, se recolectaron células diana con tripsina/EDTA y se determinó la viabilidad utilizando ViCell. Se sembraron 20.000 células/pocillo en placas de fondo plano y paredes blancas de 96 pocillos (Greiner Bio-one, nº 655098) y se añadieron anticuerpos diluidos o medio (para los controles) en el intervalo de concentraciones indicado (0,4 pM a 100 nM). A continuación, se recolectaron las células informadoras Jurkat-NFAT y se evaluó la viabilidad utilizando ViCell. Se resuspendieron las células en medio de cultivo

celular y se añadieron a las células tumorales con el fin de obtener una E:T final de 2,5:1 y un volumen final de 100 µl en cada pocillo. Las células se incubaron durante 4 h a 37°C en un incubador humidificado. Al final del tiempo de incubación se añadieron 100 µl/pocillo de solución ONE-Glo (1:1 ONE-Glo y volumen de medio de ensayo por cada pocillo) a los pocillos y se incubaron durante 10 min. a temperatura ambiente en la oscuridad. Se detectó la luminiscencia utilizando el lector de ELISA WALLAC Victor3 (PerkinElmer2030), 1 s/pocillo como tiempo de detección.

La figura 10 muestra que la molécula de CBT CD3 ACE que contenía el ligante de ACE T84.66 quimérico parental (molécula A) indujo tanto la activación de las células T Jurkat no sólo en presencia de células tumorales de nivel alto e intermedio de expresión de ACE (MKN45 y LS174T, respectivamente), sino también en presencia de las células epiteliales primarias CCD841 con niveles muy bajos de expresión de ACE o en ausencia de células diana (figura 10A).

En contraste, la molécula de CBT CD3 ACE que contenía el ligante humanizado (molécula B) indujo la activación de las células T Jurkat sólo en presencia de la línea de células tumorales MKN45 y LS174T pero no en presencia de la línea de células epiteliales primarias o en ausencia de dianas (figura 10B). Estos resultados muestran inesperadamente que la molécula que comprende el ligante de ACE humanizado es mejor en términos de seguridad.

Ejemplo 5

Comparación de moléculas biespecíficas anti-ACE / anti-CD3 que comprenden diferentes ligantes de ACE humanizados

Ejemplo 5A

Activación de células T y eliminación de células tumorales inducida por moléculas de CBT CD3 ACE que comprenden diferentes ligantes de ACE humanizados

El impacto del ligante de ACE (variante humanizada 1 (SEC ID nº 22 y nº 23) frente a diferentes ligantes de ACE humanizados (SEC ID nº 30 y nº 31, no basados en T84.66)) sobre la potencia final del CBT ACE para inducir la lisis de células tumorales se evaluó con un ensayo clásico de lisis de células tumorales tal como se ha indicado anteriormente (Ejemplo 3B).

Brevemente, las células diana incluidas en dicho ensayo eran BxPC-3, NCI-H2122 (ATCC nº CRL-5985, una línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas,

~13.300 sitios de unión de ACE), COR-L105 (Sigma-Aldrich nº 92031918, una línea celular de adenocarcinoma pulmonar humana, ~1.200 sitios de unión de ACE) y HBEpiC (Chemie Brunschwig AG nº 3210, células epiteliales bronquiales humanas, <500 sitios de unión de ACE). La molécula de CBT CD3 ACE que comprende el ligante de ACE de la variante humanizada 1 (molécula B) se añadió en el intervalo de concentraciones indicado de 1 pM a 20 nM (por triplicado), la molécula de CBT CD3 ACE que comprende los diferentes ligantes de ACE humanizado (es decir, una molécula de CBT CD3 ACE de estructura similar a la de la molécula B, pero que comprende un ligante de ACE diferente, ver SEC ID nº 42 a nº 45) se añadió en el intervalo de concentraciones indicado de 6 pM a 100 nM. Se añadieron CMSP a las células diana a una proporción E:T final de 10:1. Se detectó la lisis de las células tumorales o epiteliales primarias a las 47 h de incubación con las moléculas de CBT CD3 ACE indicadas.

Posteriormente, las CMSP de dicho ensayo se recolectaron y se tiñeron para el marcador de activación temprana CD69 sobre las células T CD8⁺ humanas tal como se ha indicado anteriormente.

La figura 11 A-D muestra que el CBT CD3 ACE basado en la variante humanizada 1 (molécula B del Ejemplo 2) indujo una activación más fuerte de las células T con la unión simultánea a células diana T efectoras y positivas para ACE en comparación con la molécula de CBT basada en los diferentes ligantes de ACE humanizados (a los que se hace referencia a continuación como "molécula X", SEC ID nº 42 a nº 45).

Lo anterior está en línea con los datos de lisis de células tumorales ilustrados en la figura 11 E-H, en la que se observa una eliminación más fuerte de las células tumorales expresantes de ACE con la molécula basada en la variante humanizada 1. Notablemente, ninguna de las moléculas de CBT CD3 ACE indujo lisis de las células HBEpiC epiteliales primarias de bajo nivel de ACE.

En conjunto, la molécula CBT CD3 ACE basada en la variante humanizada 1 (molécula B) es capaz de eliminar células tumorales con niveles de ACE mucho más bajos que el CBT CD3 ACE basado en un ligante de ACE humanizado diferente (molécula X), manteniendo la ventana de seguridad.

Ejemplo 5B

Proliferación de células T inducida por moléculas de CBT CD3 ACE que comprenden diferentes ligantes de ACE humanizados

Como lectura alternativa, las moléculas de CBT utilizadas en el Ejemplo 5A se analizaron para su capacidad de inducir la proliferación de células T con el entrecruzamiento en presencia de las células diana tumorales respectivas (MKN45, LS174T, HT29). A modo de control, también se incluyeron las células epiteliales primarias CCD841 CoN con niveles de expresión de ACE muy bajos, como células diana alternativas.

Brevemente, se ajustó la densidad de CMSP humanas recién aisladas a 1 millón de células por ml en PBS caliente y se tiñeron con CFSE 0,1 μ M en un incubador humidificado a 37°C durante 15 minutos. Se detuvo la tinción mediante la adición de 1/10 volumen de FCS, que se incubó durante 1 min. a temperatura ambiente. A continuación, las células se centrifugaron, se resuspendieron en medio precalentado y se incubaron durante 30 min. adicionales en un incubador humidificado a 37°C para eliminar el CFSE restante. Tras la incubación, las células se lavaron una vez con medio caliente, se contaron y se resuspendieron en medio a razón de 2 millones de células por ml.

Se sembraron en placa 0,02 millones de células diana en cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos y se añadieron diferentes moléculas de CBT a las concentraciones indicadas. Se añadieron CMSP marcadas con CFSE con el fin de obtener una proporción E:T final de 10:1 y las placas de ensayo se incubaron durante cinco días en un incubador humidificado a 37°C.

El día cinco, se recolectaron las células efectoras, se lavaron dos veces con tampón FACS (PBS, BSA al 0,1%) y se tiñeron para la expresión superficial de CD4 y CD8. Se analizó la proliferación de las diferentes subpoblaciones de células T utilizando un BD FACS Fortessa, dotado de software PD FACS Diva. Se analizaron las curvas de proliferación con GraphPadPrism5.

La figura 12 muestra que el CBT CD3 ACE basado en la variante humanizada 1 (molécula B) indujo una activación más fuerte de las células T y la posterior proliferación de las células T en presencia de células diana tumorales positivas para ACE en comparación con el CTB CD3 ACE basado en el ligante diferente de ACE humanizado (molécula X). Se muestra la proliferación de las células T CD8⁺ en la figura 12 A-D; la proliferación de las células T CD4⁺ se muestra en la figura 12 E-H.

Notablemente, incluso tras 5 días de incubación, no pudo observarse ningún signo de activación significativa de las células T y la posterior proliferación de las células T con cualquiera de las moléculas en presencia de células epiteliales primarias (figura 12, células CCD841 CoN).

Lo anterior confirma además la ventana favorable de potencia y seguridad del CBT CD3 ACE basada en la variante humanizada 1 (molécula B), incluso en comparación con el CBT CD3 ACE basado en un ligante de ACE humanizado diferente (molécula X).

Ejemplo 5C

Unión de diferentes moléculas biespecíficas de células T (CTB) anti-ACE/anti-CD3 a células

La unión de las moléculas de CBT utilizadas en los Ejemplos 5A y B se sometió a ensayo en diferentes células tumorales expresantes de ACE y Jurkat expresantes de CD3 (DSMZ nº ACC 282).

Brevemente, las células se recolectaron, se contaron y se comprobó su viabilidad y se resuspendieron 2×10^6 células/ml en tampón de FACS (100 μ l de PBS con BSA al 0,1%). Se incubaron 100 μ l de suspensión celular (que contenía $0,2 \times 10^6$ células) en placa de fondo redondo de 96 pocillos durante 30 min. a 4°C con concentraciones crecientes de la IgG ACE (31 pM a 500 nM), se lavaron dos veces con PBS frío con BSA al 0,1%, se reincubaron durante 30 min. adicionales a 4°C con anticuerpo secundario fragmento F(ab')₂ AffiniPure específico de fragmento Fc γ de cabra anti-IgG humano conjugado con FITC (Jackson Immuno Research Lab PE nº 109-096-008, prediluido 1:40 en PBS con BSA al 0,1%), se lavó dos veces con PBS frío BSA al 0,1% y se fijó utilizando 150 μ l de PBS con BSA al 0,1% que contenía PFA al 2%, e incubación a 4°C durante 20 min. A continuación, las células se lavaron una vez durante 8 min. a 400xg a 4°C y finalmente se resuspendieron en 150 μ l de tampón FACS para la medición de FACAS. Se midió la fluorescencia utilizando MACSQuant de Miltenyi.

Se obtuvieron las curvas de unión y los valores de EC₅₀ y se calcularon utilizando GraphPadPrism6 (figura 16A, unión a las células MKN45; figura 16B, unión a las células LS-174T; figura 16C, unión a las células HT-29; figura 16D, Tabla 6).

La figura 16 muestra que la molécula CD3 ACE basada en la variante humanizada 1 (molécula B) muestra una mejor unión a las células tumorales expresantes de ACE que el CBT CD3 ACE basado en un ligante de ACE humanizado diferente (molécula X) (mejores valores de EC₅₀ y unión máxima, particularmente sobre células diana con un nivel de expresión de ACE intermedio y bajo). Ambas moléculas de CTB mostraron una unión dependiente de la concentración a CD3 humano sobre células Jurkat.

TABLA 6. Unión de la molécula de CBT CD3 ACE B y la molécula de CBT CD3 ACE X a las células (valores de EC₅₀, basados en las curvas de unión mostradas en la figura 16, calculados con Graph Pad Prism).

Línea celular	Proveedor	Sitios de unión de ACE	Molécula B EC ₅₀ de la unión (nM)	Molécula X EC ₅₀ de la unión (nM)
MKN45	DSMZ #ACC409	~513.300	26,61	27,85
LS-174T	ATCC® #CL-188	~40.700	4,256	11,69
HT-29	DSMZ #ACC299	~10.000	18,66	n.c.

Se determinaron los sitios de unión de ACE mediante un análisis Qifikit basado en FACS siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando 10 µg/ml de anticuerpo anti-ACE humano (Santa Cruz Biotechnology, sc-23928).

Ejemplo 5D

Lisis de células tumorales inducida por moléculas de CBT CD3 ACE que comprenden diferentes ligantes de ACE humanizados

Se evaluó la lisis mediada por células T de diferentes células tumorales por las moléculas de CBT CD3 ACE utilizadas en los Ejemplos 5A-C utilizando células tumorales humanas como células diana, y CMSP humanas como células efectoras. La lisis de células tumorales se detectó a las 48 h de incubación con las moléculas de CTB CD3 ACE indicadas.

Brevemente, se recolectaron las células diana con tripsina/EDTA, se lavaron y se sembraron en placa a una densidad de 25.000-30.000 células/pocillo utilizando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhiriesen durante la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante centrifugación de densidad Histopaque de preparaciones de linfocitos enriquecidas de sangre heparinizada (capas leucocitarias) obtenida de donantes humanos sanos. Se diluyó sangre fresca con PBS estéril y se aplicó en capas sobre gradiente Histopaque (Sigma, nº H8889). Tras la centrifugación (450xg, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma en la parte superior de la interfase que contenía las CMSP, se descartó y las CMSP se

transfirieron a un nuevo tubo Falcon que posteriormente se rellenó con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400xg, 10 minutos, temperatura ambiente), se descartó el sobrenadante y el pellet de CMSP se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación 350xg, 10 minutos). La población de CMSP resultante se contó automáticamente (ViCell) y se mantuvo en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10% y L-alanil-L-glutamina al 1% (Biochrom, K0302) a 37°C, 5% de CO₂ en incubador celular hasta la utilización posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de lisis de células tumorales, se añadieron moléculas de CBT CD3 ACE a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,26 pM a 20 nM para el CBT CD3 ACE basado en la variante humanizada 1 (molécula B), o 1,28 pM a 100 nM para el CBT CD3 ACE basado en un ligante de ACE humanizado diferente (molécula X), por triplicado). Se añadieron CMSP a las células diana a una proporción E:T final de 10:1. Se evaluó la lisis de las células diana tras 48 h de incubación a 37°C, con 5% de CO₂ mediante cuantificación de la LDH liberada a sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, nº 11 644 793 001). Se alcanzó la lisis máxima de las células diana (=100%) mediante incubación de las células diana con Triton X-100 al 1%. La lisis mínima (=0%) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin constructo biespecífico.

La figura 17 muestra que la molécula de CBT CD3 ACE basada en la variante humanizada 1 (molécula B) indujo una lisis significativa y dependiente de la concentración de todas las líneas celulares tumorales mostradas, mientras que el CBT CD3 ACE sobre el ligante de ACE humanizado diferente (molécula X) indujo la lisis tumoral de KatoIII y en menor grado de NCI-H2122 únicamente. Lo anterior claramente demuestra la potencia más alta de la molécula B que la molécula X, especialmente para las líneas celulares tumorales con niveles de expresión de ACE bastante bajos.

Se calcularon los valores de EC₅₀ de lisis de células tumorales con Graph Pad Prism6 y se proporcionan en la Tabla 7 (48 h).

TABLA 7. Valores de EC₅₀ (pM) para la lisis mediada por células T de células tumorales de nivel bajo de expresión de ACE inducidas por diferentes moléculas de CTB CD3 ACE tras 48 h.

Línea celular	Indicación tumoral	Referencia	Sitios de unión de ACE	Molécula B EC50 de la lisis	Molécula X EC50 de la lisis
Kato III	Cáncer	ECACC nº	~22.700	55,4	8233

	gástrico	86093004			
HCC1954	Cáncer de mama	ATCC nº CRL-2338	~15.750	421,7	-
NCI-H2122	Cáncer de pulmón	ATCC nº CRL-598	~13.300	27,9	-
CX-1	Cáncer de colon	DSMZ nº ACC 129	~4.750	430,4	-
NCI-H596	Cáncer de pulmón	ATCC nº HTB-178	~1.900	18,5	-

Se determinaron los sitios de unión de ACE mediante un análisis Qifikit basado en FACS siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando 10 µg/ml de anticuerpo anti-ACE humano (Santa Cruz Biotechnology, sc-23928).

Ejemplo 6

Comparación de moléculas biespecíficas anti-ACE / anti-CD3 que comprenden diferentes conectores entre ligantes de ACE y de CD3

Ejemplo 6A

Unión de moléculas de CTB CD3 ACE que comprenden diferentes conectores entre ligantes de ACE y de CD3 a células

La unión de una variante de la molécula B con un conector más largo entre Fab de CD3 y Fab de ACE (molécula E) se comparó con la molécula B para su unión a las células. Se sometió a ensayo la unión a ACE humano en células MKN45, LS174T o HT29; la unión a CD3 humano se sometió a ensayo en células Jurkat. La configuración y condiciones del ensayo eran las indicadas anteriormente (Ejemplo 3A). Los resultados se muestran en la figura 13. Se obtuvieron curvas de unión utilizando GraphPadPrism5 (A, unión a células MKN45; B, unión a células LS174T; C, unión a células HT29; D, unión a células Jurkat). La figura 13 muestra una unión comparable de ambas moléculas a ACE humano, así como a CD3 humano sobre las células.

Ejemplo 6B

Lisis de diversas células tumorales por moléculas de CTB CD3 ACE que comprenden diferentes conectores entre ligantes de ACE y de CD3

Con el fin de evaluar adicionalmente el impacto de la longitud del conector sobre la potencia de la molécula de inducir la lisis mediada por células T de células tumorales

expresantes de ACE, se llevó a cabo un ensayo clásico de lisis de células tumorales, tal como se ha indicado anteriormente (por ejemplo, en el Ejemplo 3B). Las moléculas de CTB CD3 ACE del Ejemplo 6A (molécula B y una molécula correspondiente con un conector más largo entre los ligantes de ACE y de CD3, molécula E) se añadieron a las concentraciones indicadas (intervalo de 1 pM a 20 nM, por triplicado) y se evaluó la lisis de las células tumorales tras 24 h (figura 14 A-D) y tras 48 h (figura 14 E-H). Los valores de EC₅₀ se calcularon con GraphPadPrism5 y se proporcionan en la Tabla 8.

La figura 14 muestra una lisis comparable de las células tumorales que expresan niveles altos (MKN45) o intermedios de ACE (LS174T) y ninguna eliminación de las células epiteliales primarias CCD841.

Sin embargo, las células diana con niveles de expresión de ACE bajos (HT29) mostraban una eliminación global más elevada con la molécula que comprendía el conector más largo.

TABLA 8. Valores de EC₅₀ (pM) para la eliminación mediada por células T de células tumorales HT29 de baja expresión de ACE inducidas por diferentes moléculas de CTB CD3 ACE tras 24 h y 48 h.

EC ₅₀ (pM)	Molécula B	Molécula E
24 h	512	679
48 h	338	342

Ejemplo 7

Lisis de células tumorales y activación de las células T inducidos por la molécula de CTB CD3 ACE

Ejemplo 7A

Lisis de líneas celulares con diferentes niveles de expresión de ACE por la molécula de CTB CD3 ACE B

En otro experimento (figura 18A), la molécula de CTB CD3 ACE B se caracterizó en presencia de la línea celular HBEPiC epitelial primaria de bajo nivel de expresión de ACE frente a diferentes líneas de células tumorales con el fin de evaluar su seguridad. La configuración del ensayo y el abanico de anticuerpos fue el indicado en el Ejemplo 5D para la molécula B. Se calcularon los valores de EC₅₀ de lisis de células tumorales utilizando Graph Pad Prism6 y se proporcionan en la Tabla 9 (48 h).

Tal como se ilustra en la figura 18A y en la Tabla 9, las células epiteliales primarias no resultaron eliminadas por la molécula de CTB CD3 ACE, mientras que las líneas de células tumorales con niveles diferentes de expresión de ACE pudieron lisarse con la molécula de CTB CD3 ACE de una manera dependiente de la concentración.

TABLA 9. Valores de EC₅₀ (pM) para la lisis mediada por células T de células tumorales expresantes de ACE inducida por la molécula de CTB CD3 ACE B tras 48 h.

Línea celular	Referencia	Sitios de unión de ACE	Molécula B
BxPC-3	ECACC nº 93120816	~44.000	49,63
NCI-H2122	ATCC nº CRL-598	~13.300	237,5
COR-L105	Sigma-Aldrich nº 92031918	~ 1.200	<i>n.c.*</i>
HBEPiC	ScienCell nº 3210	< 600	-

* La EC₅₀ para COR-L105 no pudo calcularse correctamente debido a que la curva no alcanzó la saturación a concentraciones elevadas.

Se determinaron los sitios de unión de ACE mediante un análisis Qifikit basado en FACS siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando 10 µg/ml de anticuerpo anti-ACE humano (Santa Cruz Biotechnology, sc-23928).

En otro experimento (figura 19A), la molécula de CTB CD3 ACE B se caracterizó en presencia de otra línea celular epitelial primaria de bajo nivel de expresión de ACE (CCD841CoN) frente a diferentes líneas de células tumorales con el fin de evaluar su seguridad, utilizando otro donante de CMSP. La configuración del ensayo y el abanico de anticuerpos fue el indicado en el Ejemplo 5D para la molécula de CTB CD3 ACE B. Se calcularon los valores de EC₅₀ de lisis de células tumorales utilizando Graph Pad Prism6 y se proporcionan en la Tabla 10 (48 h).

TABLA 10. Valores de EC₅₀ (pM) para la lisis mediada por células T de células tumorales expresantes de ACE inducida por la molécula de CTB CD3 ACE B tras 48 h.

Línea celular	Referencia	Sitios de unión de ACE	Molécula B
MKN45	DSMZ nº ACC409	~513.300	41,24
BxPC-3	ECACC nº 93120816	~44.000	46,98
HT-29	DSMZ nº ACC299	~10.000	562,7
CCD-841CoN	ATCC nº CRL-1790	< 600	-

Se determinaron los sitios de unión de ACE mediante un análisis Qifikit basado en FACS siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando 10 µg/ml de anticuerpo anti-ACE humano (Santa Cruz Biotechnology, sc-23928).

Tal como se ilustra en la figura 19A y en la Tabla 10, las células epiteliales primarias no resultaron eliminadas por la molécula de CTB CD3 ACE B, mientras que las líneas de células tumorales con niveles diferentes de expresión de ACE pudieron lisarse con la molécula de CTB CD3 ACE de una manera dependiente de la concentración.

Ejemplo 7B

Regulación positiva de CD69 en células efectoras CD4⁺ tras la eliminación de células tumorales expresantes de ACE inducida por la molécula de CTB CD3 ACE B

Se evaluó la activación de las células efectoras CD4⁺ y CD8⁺ tras la lisis de células tumorales expresantes de ACE mediadas por la molécula de CTB CD3 ACE B mediante análisis de FACS utilizando anticuerpos que reconocen el marcador CD69 de activación de células T (marcador de activación temprana).

Las condiciones del anticuerpo y del ensayo de eliminación fueron esencialmente las indicadas anteriormente (Ejemplo 5D), utilizando el mismo intervalo de concentraciones de anticuerpo (0,26 pM a 20 nM, por triplicado), proporción E:T de 10:1 y un tiempo de incubación de 48 h.

Tras la incubación, se transfirieron las CMSP a una placa de fondo redondo de 96 pocillos, se centrifugaron a 350xg durante 5 min. y se lavaron dos veces con PBS que contenía BSA al 0,1%. Se llevó a cabo la tinción superficial de CD8 (FITC anti-CD8 humano, BD Biosciences nº 555634), CD4 (PECy7 anti-CD4 humano, BD Biosciences nº 557852) y

CD69 (PE-anti-CD69 humano, BioLegend nº 310906) siguiendo las indicaciones del proveedor. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1% y se fijaron durante 30 min. a 4°C utilizando 150 µl/pocillo de tampón de FACS que contenía PFA al 2%. Tras la centrifugación, las muestras se resuspendieron en 200 µl/pocillo de PBS con BSA al 0,1% y se analizaron utilizando un BD FACS Fortessa.

La figura 18B muestra que la molécula de CTB CD3 ACE B indujo la activación de las células T dependiente de la concentración en presencia de diferentes líneas de células tumorales expresantes de ACE, medida como porcentaje de células T CD4⁺ positivas para CD69. En contraste, no se produjo la activación de las células T en presencia de células epiteliales primarias de bajo nivel de expresión de ACE. Se obtuvieron resultados similares para las células CD8⁺ (no mostrados). Los datos sugieren que la administración terapéutica de la molécula de CTB CD3 ACE B no debería conducir a efectos adversos sobre las células epiteliales primarias con niveles bajo de expresión de ACE.

Se calcularon los valores de EC₅₀ de activación de las células T utilizando Graph Pad Prism6 y se proporcionan en la Tabla 11.

TABLA 11. Valores de EC₅₀ (pM) para la activación de células T con la unión simultánea de la molécula de CTB CD3 ACE B a células expresantes de ACE y a células T expresantes de CD3 tras 48 h.

Línea celular	Referencia	Sitios de unión de ACE	Molécula B
BxPC-3	ECACC nº 93120816	~44.000	84,74
NCI-H2122	ATCC nº CRL-598	~13.300	149,1
COR-L105	Sigma-Aldrich nº 92031918	~ 1.200	<i>n.c.*</i>
HBEPiC	ScienCell nº 3210	< 600	-

* La EC₅₀ para COR-L105 no pudo calcularse correctamente debido a que la curva no alcanzó la saturación a concentraciones elevadas.

Se determinaron los sitios de unión de ACE mediante un análisis Qifikit basado en FACS siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando 10 µg/ml de anticuerpo anti-ACE humano (Santa Cruz Biotechnology, sc-23928).

Ejemplo 7C

Regulación positiva de CD25 en células efectoras CD4⁺ tras la eliminación de células tumorales expresantes de ACE inducida por la molécula de CTB CD3 ACE B

Se evaluó la activación de las células efectoras CD4⁺ y CD8⁺ tras la lisis de células tumorales expresantes de ACE mediadas por la molécula de CTB CD3 ACE B mediante análisis de FACS utilizando anticuerpos que reconocen el marcador CD25 de activación de células T (marcador de activación tardía).

Las condiciones del anticuerpo y del ensayo de eliminación fueron esencialmente las indicadas anteriormente (Ejemplo 5D), utilizando el mismo intervalo de concentraciones de anticuerpo (0,26 pM a 20 nM, por triplicado), proporción E:T de 10:1 y un tiempo de incubación de 48 h.

Tras la incubación, se transfirieron las CMSP a una placa de fondo redondo de 96 pocillos, se centrifugaron a 350xg durante 5 min. y se lavaron dos veces con PBS que contenía BSA al 0,1%. Se llevó a cabo la tinción superficial de CD8 (FITC anti-CD8 humano, Biolegend nº 344704), CD4 (PECy7 anti-CD4 humano, Biolegend nº 344612) y CD25 (APC anti-CD25 humano, Biolegend nº 302610) siguiendo las indicaciones del proveedor. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1% y se fijaron durante 30 min. a 4°C utilizando 150 µl/pocillo de tampón de FACS que contenía PFA al 2%. Tras la centrifugación, las muestras se resuspendieron en 200 µl/pocillo de PBS con BSA al 0,1% y se analizaron utilizando un BD FACS Fortessa.

La figura 19B muestra que la molécula de CTB CD3 ACE B indujo la activación de las células T dependiente de la concentración en presencia de diferentes líneas de células tumorales expresantes de ACE, medida como porcentaje de células T positivas para CD25. En contraste, no se produjo la activación de las células T en presencia de células epiteliales primarias de bajo nivel de expresión de ACE. Se obtuvieron resultados similares para las células CD8⁺ (no mostrados). Los datos sugieren que la administración terapéutica de la molécula de CTB CD3 ACE B no debería conducir a efectos adversos sobre las células epiteliales primarias con niveles bajo de expresión de ACE.

Ejemplo 8

Unión específica de la molécula CTB CD3 ACE B a ACECAM5 humana

Para demostrar la unión específica de la molécula CTB CD3 ACE B a ACECAM5 humana, pero no a los otros elementos más próximos de la familia ACECAM1 y ACECAM6, se evaluó la unión de la molécula CTB CD3 ACE B a células HEK293T transfectadas transitorias, que expresan ACECAM5, ACECAM1 o ACECAM6.

Brevemente, las células se recolectaron, se contaron y se comprobó su viabilidad y se resuspendieron 1×10^6 células/ml en tampón de FACS (100 μ l de PBS con BSA al 0,1%). Se sembraron 100 μ l de la suspensión celular (que contiene $0,1 \times 10^6$ células) en placas de fondo redondo de 96 pocillos y se lavaron dos veces con 150 μ l de PBS frío. Las células se tiñeron durante 30 min. a 4°C utilizando una suspensión prediluida 1:5.000 del pigmento de viabilidad fijable eFluor660 (eBioscience, nº 65-0864-14) en PBS. Después, las células se lavaron dos veces con PBS, una vez con tampón FACS y se tiñeron durante 30 min. a 4°C con concentraciones crecientes de la molécula CTB CD3 ACE B. El intervalo de concentraciones de anticuerpo era de entre 30,5 pM y 500 nM. Se lavaron las células dos veces con PBS frío con BSA al 0,1%, se reincubaron durante 30 min. adicionales a 4°C con anticuerpo secundario fragmento F(ab')₂ AffiniPure específico de fragmento Fcg de cabra anti-IgG humano conjugado con FITC (Jackson Immuno Research Lab PE nº 109-096-008, prediluido 1:50 en PBS con BSA al 0,1%), se lavó dos veces con PBS frío con BSA al 0,1% y se fijó utilizando 150 μ l de PBS con BSA al 0,1% que contenía PFA al 2%, e incubación a 4°C durante 20 min. A continuación, las células se lavaron una vez durante 8 min. a 400xg a 4°C y finalmente se resuspendieron en 150 μ l de tampón FACS para la medición de FACS. Se midió la fluorescencia utilizando un BD FACS Canto II. Las curvas de unión se obtuvieron utilizando GraphPadPrism6 (figura 20A). Para determinar la eficacia de transfección, todos los transfectantes se tiñeron durante 30 min. a 4°C, utilizando un anticuerpo anti-CD66 humano disponible comercialmente (FITC-anticuerpo de ratón anti-CD66 humano, BD Biosciences nº 551479, 20 μ l por muestra) (figura 20B). Tal como se muestra en la figura 20B, se detectó el nivel de expresión más alto para ACECAM1 humano, seguido de ACECAM5 y ACECAM6.

La figura 20A demuestra claramente que la molécula de CTB CD3 ACE B muestra una unión dependiente de la concentración a transfectantes transitorios que expresan ACECAM5 humano, pero no a cualquiera de los otros transfectantes, que expresan ACECAM1 o ACECAM6 humanos, demostrando la especificidad de la unión al ACE.

Ejemplo 9

FC de dosis únicas de moléculas de CTB CD3 ACE que comprenden diferentes ligantes de ACE humanizados en ratones NOG sanos

Se llevaron a cabo estudios de farmacocinética de dosis única (FCDU) en ratones NOG sanos con el fin de evaluar la exposición de la molécula de CTB CD3 ACE B y de la molécula CTB CD3 ACE X (figura 15). Se administró una inyección intravenosa (i.v.) de bolo de 0,5 mg/kg en ratones NOG y se extrajeron muestras de sangre en puntos temporales seleccionados para la evaluación farmacocinética. Se utilizó un inmunoensayo genérico para medir las concentraciones totales de las moléculas de CTB CD3 AC3. El intervalo de calibración de la curva de estándares para ambas moléculas de CTB era de 0,078 a 5 ng/ml, en donde 1,5 ng/ml era el límite inferior de cuantificación (LIC).

Se observó una caída bifásica con una semivida de 10 días (análisis no compartimental) para la molécula de CTB CD3 ACE B y 6,5 días para la molécula de CTB CD3 ACE X. Se detectó una tasa de eliminación (TE) de 8,1 ml/d/kg para la molécula de CTB CD3 ACE B y 19 ml/d/kg para la molécula de CTB CD3 ACE X, respectivamente (Tabla 12). Globalmente, la molécula de CTB CD3 ACE B mostró una semivida más prolongada y una TE más baja en ratones NOG que la molécula de CTB CD3 ACE X.

Se utilizó Phoenix v6.4 de Pharsight Ltd. para el análisis de FQ, modelaje y simulación.

TABLA 12. Parámetros farmacocinéticos de una administración de 0,5 mg/kg de bolo i.v. de la molécula de CTB CD3 ACE en ratones NOG.

Construtto	Semivida (d)	TE (ml/d/kg)
Molécula B	10	8,1
Molécula X	6,5	19

Ejemplo 10

Actividad antitumoral de moléculas de CTB CD3 ACE que comprenden diferentes ligantes de ACE humanizados en el modelo MKN45

Se sometió a ensayo la actividad antitumoral de la molécula de CTB CD3 ACE y la molécula de CTB CD3 ACE X en ratones NOD/Shi-scid/IL-2R γ ^{null} (NOG) totalmente humanizados portadores de la línea celular de carcinoma gástrico MKN45.

Se inyectaron por vía subcutánea (s.c.) 1X10⁶ células MKN45 (originalmente obtenidas del DSMZ -Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) en ratones NOG totalmente humanizados de 14 semanas de edad que portaban niveles fisiológicos de células B y T humanas circulantes (Hayakawa et al., Stem Cells 27:175-182, 2009). Al alcanzar el volumen tumoral medio 100 mm³, los ratones recibieron la molécula de CTB CD3 ACE X o la molécula CTB CD3 ACE B i.v. a la dosis de 2,5 mg/kg administrados dos veces o una vez a la semana y a la dosis de 0,5 mg/kg administrados una vez a la semana (figura 21). La molécula de CTB CD3 ACE B mostró una actividad antitumoral significativamente más fuerte en todas las dosis y programas sometidos a ensayo. Resulta importante que sólo la molécula de CTB CD3 ACE B pudiese mediar en la regresión tumoral, detectando ratones libres de tumores en los grupos tratados con 2,5 mg/kg y 0,5 mg/kg (figura 21, Tabla 13).

TABLA 13. Número de ratones libres de tumores por grupo al final del estudio (día 70).

Tratamiento	Número de ratones libres de tumores al término (día de estudio 70)
Vehículo	0/9
Molécula X 2,5 mg/kg dos veces/semana	0/9
Molécula B X 2,5 mg/kg dos veces/semana	3/9
Molécula X 2,5 mg/kg una vez/semana	0/9
Molécula B 2,5 mg/kg una vez/semana	1/9
Molécula X 0,5 mg/kg una vez/semana	0/9
Molécula B 0,5 mg/kg una vez/semana	1/8

Ejemplo 11

Basándose en los datos de FCDU mostrados en el Ejemplo 9, se compiló un modelo de 2 compartimientos para describir la FC de la molécula de CTB CD3 ACE B y de la molécula de CTB CD3 ACE X en ratones NOG (figura 22). Se simularon los diferentes niveles y

programas de dosis seleccionados para el estudio de eficacia de rango de dosis descrito en el ejemplo siguiente. Tal como se muestra en la figura 22, para compensar la menor tasa de eliminación de la molécula de CTB CD3 ACE B, se adaptó el diseño del estudio. La frecuencia de administración de la molécula de CTB CD3 ACE X se incrementó a un programa de dos veces a la semana y también se utilizaron niveles de dosis más altos, de hasta 12,5 mg/kg. Los perfiles simulados mostraban que con una dosis quincenal de 12,5 mg de molécula de CTB CD3 ACE X, la exposición era sustancialmente más elevada que con 0,5 mg/kg de la molécula de CTB CD3 ACE B.

Ejemplo 12

Estudio de eficacia de rangos de dosis con las moléculas de CTB CD3 ACE que comprendían diferentes ligantes de ACE humanizados en el modelo MKN45

Para evaluar más específicamente el factor de diferencia in vivo de actividad antitumoral entre las dos moléculas, se sometieron a ensayo la molécula de CTB CD3 ACE B y la molécula de CTB CD3 ACE X a un rango más grande de dosis en ratones NSG totalmente humanizados que portaban la línea celular de carcinoma gástrico MKN45 (figura 23).

En ratones NSG totalmente humanizados se inyectaron s.c. 1×10^6 células MKN45. Al alcanzar el volumen tumoral medio de 180 mm³, los ratones recibieron la molécula de CTB CD3 ACE B o la molécula de CTB CD3 ACE X i.v. a las diferentes dosis y programas ilustrados en la figura 23. Las dosis y programas se seleccionaron basándose en el análisis indicado en el Ejemplo 11. Los datos de eficacia obtenidos claramente muestran que la molécula de CTB CD3 ACE B podría mediar en una actividad antitumoral más fuerte que la de la molécula de CTB CD3 ACE X con un factor de diferencia significativo de por lo menos 25 veces (tal como se señala con el asterisco en el gráfico de la figura 23).

Ejemplo 13

Actividad antitumoral de moléculas de CTB CD3 ACE que comprenden diferentes ligantes de ACE humanizados en el modelo HPAF-II

Se sometió a ensayo la actividad antitumoral de la molécula de CTB CD3 ACE B y de la molécula de CTB CD3 ACE X en ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) portadores de la línea celular de carcinoma pancreático humano HPAF-II y se transfirieron con células mononucleares periféricas humanas (CMSP). Brevemente, se inyectaron por vía subcutánea (s.c.) en ratones NOG hembra 1×10^6 células HPAF-II (originalmente obtenidos de la American Type Culture Collection (ATCC)). Al alcanzar el volumen tumoral medio 150 mm³, los ratones recibieron la inyección i.v. de CMSP humanas (10×10^6 células

por ratón) como fuente de células T humanas. Tres días después, los ratones recibieron la molécula de CTB CD3 ACE B o la molécula de CTB CD3 ACE X, i.v. a una dosis de 2,5 mg/kg, administrada una vez a la semana Tal como se ilustra en la figura 24, tras 3 semanas de tratamiento, ambas moléculas de CTB mostraron una potente actividad antitumoral, siendo capaz de mediar en la regresión tumoral sólo la molécula B (el día 32, día de finalización del estudio) (figura 24).

Ejemplo 14

FC de dosis únicas de moléculas de CTB CD3 ACE que comprenden diferentes ligantes de ACE humanizados en monos Cynomolgus

Se llevaron a cabo estudios de farmacocinética de dosis única (FCDU) en monos Cynomolgus con el fin de evaluar la exposición de la molécula de CTB CD3 ACE B y de la molécula CTB CD3 ACE X, respectivamente (figura 25). Se administró una administración de bolo i.v. de 0,01 mg/kg y se extrajeron muestras de sangre en puntos temporales seleccionados para la evaluación farmacocinética. Se utilizaron inmunoensayos específicos para medir las concentraciones de competencia de unión de la molécula de CTB CD3 ACE B y de la molécula de CTB CD3 ACE X. Para la molécula de CTB CD3 ACE X, el límite inferior de cuantificación (LIC) era de 0,1 ng/ml y para la molécula de CTB CD3 ACE B, 0,44 ng/ml.

Se observó una caída bifásica, con una semivida de 184 ± 40 horas (análisis no compartimental) para la molécula de CTB CD3 ACE B frente a 32 ± 11 horas para la molécula de CTB CD3 ACE X. Se detectó una tasa de eliminación (TE) de $7 \pm 0,9$ ml/d/kg para la molécula de CTB CD3 ACE B y de 25 ± 6 ml/d/kg para la molécula de CTB CD3 ACE X. Globalmente, la molécula de CTB CD3 ACE B mostró propiedades similares a Ig y mostró una semivida más prolongada y una tasa de eliminación más lenta en monos Cynomolgus que la molécula de CTB CD3 ACE X.

TABLA 14. Resumen de parámetros farmacocinéticos de la molécula de CTB CD3 ACE B en suero tras una única administración intravenosa (bolo) de 0,01 mg/kg en monos Cynomolgus (N=3).

ID	Semivida (h)	TE (ml/día/kg)	Cmax (ng/ml)	AUC _{INF} (h*ng/ml)	Vc (ml/kg)
Media	184	7	257	33351	39
DE	40	0,9	18	4259	2

CV%	22	13	7	13	6
-----	----	----	---	----	---

TABLA 15. Resumen de parámetros farmacocinéticos de la molécula de CTB CD3 ACE X en suero tras una única administración intravenosa (bolo) de 0,01 mg/kg en monos Cynomolgus (N=5).

ID	Semivida (h)	TE (ml/día/kg)	Cmax (ng/ml)	AUC _{INF} (h*ng/ml)	Vc (ml/kg)
Media	32	25	321	9991	31
DE	11	6	24	2133	2
CV%	34	23	7	21	7

Se utilizó Phoenix v6.4 de Pharsight Ltd. para la evaluación FC.

* * *

Aunque la invención anteriormente proporcionada ha sido descrita en detalle a título ilustrativo y ejemplar con fines de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitativas del alcance de la invención. Las exposiciones de toda la literatura de patentes y científica citada en la presente memoria se incorporan expresamente en su totalidad como referencia.