

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 897 217**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2017 PCT/EP2017/074576**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2018 WO18060301**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2017 E 17781423 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.09.2021 EP 3519437**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos frente a p95HER2**

30 Prioridad:

30.09.2016 EP 16191933

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

28.02.2022

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**KLEIN, CHRISTIAN;
BACAC, MARINA;
FREIMOSER-GRUNDSCHOBBER, ANNE;
HERTER, SYLVIA;
ARRIBAS, JOAQUÍN y
VICARIO, ROCÍO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 897 217 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos frente a p95HER2

5 **Campo de la invención**

La presente invención en general se refiere a moléculas de unión a antígeno biespecíficas para activar linfocitos T. Además, la presente invención se refiere a polinucleótidos que codifican dichas moléculas de unión a antígeno biespecíficas, y vectores y células huésped que comprenden dichos polinucleótidos. La invención se refiere además a procedimientos para producir las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención y a estas moléculas de unión a antígeno biespecíficas para su uso en el tratamiento de enfermedad.

Antecedentes

15 La destrucción selectiva de una célula individual o un tipo de célula específico a menudo es deseable en una variedad de entornos clínicos. Por ejemplo, un objetivo principal del tratamiento del cáncer es destruir específicamente las células tumorales, mientras que deja las células y tejidos sanos intactos y sin daños.

20 Una forma atractiva de lograr esto es induciendo una respuesta inmunitaria contra el tumor, para hacer que las células efectoras inmunitarias tales como los linfocitos citolíticos naturales (NK) o los linfocitos T citotóxicos (CTL) ataquen y destruyan las células tumorales. Los CTL constituyen las células efectoras más potentes del sistema inmunitario, sin embargo, no se pueden activar por el mecanismo efector mediado por el dominio Fc de anticuerpos terapéuticos convencionales.

25 A este respecto, los anticuerpos biespecíficos diseñados para unirse con un "brazo" a un antígeno de superficie en células diana, y con el segundo "brazo" a un componente invariante activador del complejo receptor de linfocitos T (TCR), se han vuelto de interés en los últimos años. La unión simultánea de un anticuerpo de este tipo a ambas de sus dianas forzará una interacción temporal entre la célula diana y el linfocito T, provocando la activación de cualquier linfocito T citotóxico y la posterior lisis de la célula diana. Por ende, la respuesta inmunitaria se redirige a las células diana y es independiente de la presentación antigénica de péptidos por la célula diana o la especificidad del linfocito T como sería pertinente para la activación restringida para MHC normal de CTL. En este contexto, es crucial que los CTL solo se activen cuando una célula diana les presente el anticuerpo biespecífico, es decir, se imite la sinapsis inmunológica. Son en particular deseables los anticuerpos biespecíficos que no requieren precondicionamiento o coestimulación de linfocitos para provocar lisis eficaz de células diana.

35 Se han desarrollado varios formatos de anticuerpos biespecíficos e investigado su idoneidad para inmunoterapia mediada por linfocitos T. De estos, las denominadas moléculas BiTE (captadoras de linfocitos T biespecíficas) se han caracterizado muy bien y ya se han mostrado prometedoras en el ámbito clínico (revisado en Nagorsen y Bäuerle, *Exp Cell Res* 317, 1255-1260 (2011)). Las BiTE son moléculas scFv en tándem en las que dos moléculas scFv se fusionan por un conector flexible. Otros formatos biespecíficos que se evalúan para el acoplamiento de linfocitos T incluyen 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 (redirección de afinidad doble), que se basan en el formato de diacuerpos pero presentan un puente disulfuro C terminal para estabilización adicional (Moore *et al.*, *Blood* 117, 4542-51 (2011)). Los denominados triomabs, que son moléculas de IgG completas híbridas de ratón/rata y que también se están evaluando actualmente en ensayos clínicos, representan un formato de mayor tamaño (revisado en Seimetz *et al.*, *Cancer Treat Rev* 36, 458-467 (2010)).

50 La variedad de formatos que se están desarrollando muestra el gran potencial atribuido al redireccionamiento y activación de linfocitos T en inmunoterapia. Sin embargo, la tarea de generar anticuerpos biespecíficos adecuados para esto no es de ninguna manera trivial, sino que implica una serie de dificultades que se han de cumplir relacionados con eficacia, toxicidad, aplicabilidad y producibilidad de los anticuerpos.

55 Las construcciones pequeñas tales como, por ejemplo, las moléculas BiTE (si bien pueden reticular eficazmente células diana y efectoras) tienen una semivida en suero muy corta, lo que requiere que se administren a los pacientes por infusión continua. Por otra parte, los formatos de tipo IgG (si bien tienen el gran beneficio de una semivida larga) experimentan toxicidad asociada con las funciones efectoras naturales inherentes de las moléculas IgG. Su potencial inmunogénico constituye otro rasgo característico desfavorable de los anticuerpos biespecíficos de tipo IgG, especialmente los formatos no humanos, para un desarrollo terapéutico exitoso. Finalmente, una dificultad principal en el desarrollo general de anticuerpos biespecíficos ha sido la producción de construcciones de anticuerpos biespecíficos en una cantidad y pureza clínicamente suficientes, debido al emparejamiento incorrecto de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo de especificidades diferentes tras la coexpresión, lo que disminuye el rendimiento de la construcción correctamente ensamblada y da como resultado una serie de productos secundarios no funcionales de los que el anticuerpo biespecífico deseado puede ser difícil de separar.

65 La elección de antígenos diana y proteínas fijadoras apropiadas tanto para el antígeno de linfocitos T como para

el antígeno de células diana es otro aspecto crucial en la generación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) para aplicación terapéutica.

El receptor de tirosina cinasa HER2 se sobreexpresa en aproximadamente un 20 % de los cánceres de mama. Actualmente, los cánceres de mama positivos para HER2 se tratan con pautas posológicas que incluyen anticuerpos monoclonales frente al dominio extracelular de HER2, tales como trastuzumab, o moléculas sintéticas que inhiben su actividad tirosina cinasa. A pesar del éxito de los fármacos disponibles actualmente que se dirigen a HER2, la mayoría de los casos de cáncer de mama avanzado finalmente progresan. Además, el redireccionamiento de linfocitos T a los tumores por medio del reconocimiento de HER2 puede dar como resultado toxicidades graves, probablemente debido a los niveles fisiológicos de HER2 en el epitelio normal. Por ejemplo, se observaron acontecimientos adversos graves durante un ensayo clínico de fase I con un anticuerpo biespecífico activador de linfocitos T dirigido a HER2 (Kiewe *et al.*, Clin Cancer Res (2006) 12, 3085-3091). Por lo tanto, se necesitan tratamientos adicionales anti-HER2. En el documento WO 2016/020309 también se divulga un anticuerpo biespecífico activador de linfocitos T dirigido a HER2.

Un subgrupo de tumores de mama expresa niveles detectables de un grupo heterogéneo de fragmentos de HER2 conocidos conjuntamente como p95HER2 (revisado en Arribas *et al.*, Cancer Res 71 (2011) 1515-1519). Uno de estos fragmentos, conocido como 611-CTF o p95HER2 de 100-115 kDa (para simplificar, en lo sucesivo, denominado p95HER2), es en particular oncogénico debido a su capacidad para formar homodímeros mantenidos por enlaces disulfuro intermoleculares (Pedersen *et al.*, Mol Cell Biol 29, 3319-31 (2009)). p95HER2 parece expresarse en un subgrupo homogéneo de cánceres de mama positivos para HER2 (Parra-Palau *et al.*, J Natl Cancer Inst 106, dju291 (2014)), pero no se reconoce por, por ejemplo, trastuzumab porque el fragmento de HER2 carece del epítipo reconocido por el anticuerpo (Pedersen *et al.*, Mol Cell Biol 29, 3319-31 (2009)).

La presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas novedosas diseñadas para la activación y redirección de linfocitos T, que se dirigen a CD3 y p95HER2, que combinan buena eficacia y capacidad de producción con baja toxicidad y propiedades farmacocinéticas favorables.

Sumario de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T novedosa que se dirige a p95HER2.

En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

(a) un primer resto de unión a antígeno que se une específicamente a p95HER2;

(b) un segundo resto de unión a antígeno que se une específicamente a CD3;

en la que el primer resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada, en particular una región variable de la cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 14, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 15 y la HCDR 3 de SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera, en particular una región variable de la cadena ligera humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 17, la LCDR 2 de SEQ ID NO: 18 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 19.

En un modo de realización, el primer resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

En modos de realización particulares, el primer y/o el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab. En un modo de realización particular, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab en la 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 reemplazan entre sí (es decir, de acuerdo con dicho modo de realización, la segunda molécula Fab es una molécula Fab entrecruzada en la que los dominios variables o constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian).

En modos de realización particulares, la primera molécula Fab es una molécula Fab convencional. En otro modo de realización particular, no más de una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD3 está presente en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (es decir, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T proporciona unión monovalente a CD3).

En un modo de realización específico, CD3 es CD3 épsilon.

En un modo de realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende

5 (a) una primera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2;

(b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3, y en la 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 reemplazan entre sí;

10 en la que la primera molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada, en particular una región variable de la cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 14, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 15 y la HCDR 3 de SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera, en particular una región variable de la cadena ligera humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 17, la
15 LCDR 2 de SEQ ID NO: 18 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 19.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la proporción de un anticuerpo biespecífico deseado en comparación con productos secundarios no deseados, en particular productos secundarios de tipo Bence Jones que se producen en anticuerpos biespecíficos con un intercambio de dominios VH/VL en uno de sus brazos de unión, se puede mejorar por la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones aminoacídicas específicas en los dominios CH1 y CL (a veces denominado en el presente documento "modificaciones de carga").

20 Por tanto, en algunos modos de realización, el primer resto de unión a antígeno es una primera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2, el segundo resto de unión a antígeno es una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3, en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

y

30 i) en el dominio constante CL de la primera molécula Fab, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab, 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 de acuerdo con el índice EU de Kabat); o

35 ii) en el dominio constante CL de la segunda molécula Fab, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 del segunda molécula Fab, 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 de acuerdo con el índice EU de Kabat).

45 En un modo de realización de este tipo, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un modo de realización preferente independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab, 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 de acuerdo con el índice EU de Kabat).

50 En otro modo de realización, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

55 Aún en otro modo de realización, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un modo de 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 de acuerdo con Kabat) (en un modo de realización preferente independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

65 En un modo de realización particular, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se

sustituye por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

5 En otro modo de realización particular, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

10 En un modo de realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende

15 (a) una primera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2;

(b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

20 en la que la primera molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada, en particular una región variable de la cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR 1 de SEQ ID NO: 14, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 15 y la HCDR 3 de SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera, en particular una región variable de la cadena ligera humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR 1 de SEQ ID NO: 17, la LCDR 2 de SEQ ID NO: 18 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 19; y en la que en el dominio constante CL de la primera molécula Fab, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un modo de 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 de acuerdo con Kabat) (en un modo de realización preferente independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

25 En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende además un tercer resto de unión a antígeno que se une específicamente a p95HER2. En modos de realización particulares, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al primer resto de unión a antígeno. En un modo de realización, el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab.

30 En modos de realización particulares, el tercer y el primer resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab y la tercera molécula Fab es idéntica a la primera molécula Fab. En estos modos de realización, la tercera molécula Fab comprende por tanto las mismas sustituciones aminoacídicas, si las hay, que la primera molécula Fab. Como la primera molécula Fab, la tercera molécula Fab en particular es una molécula Fab convencional.

35 En algunos modos de realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, el primer resto de unión a antígeno y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan entre sí, opcionalmente por medio de un conector peptídico. En modos de realización particulares, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab. En un modo de realización específico de este tipo, el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En un modo de realización alternativo de este tipo, el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno.

40 En modos de realización particulares, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende adicionalmente un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable.

45 La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención puede tener diferentes configuraciones, es decir, el primer, segundo (y opcionalmente tercer) resto de unión a antígeno se pueden fusionar entre sí y al dominio Fc de diferentes formas. Los componentes se pueden fusionar entre sí directamente o, preferentemente, por medio de uno o más conectores peptídicos adecuados. Cuando la fusión de una molécula Fab es en el extremo N de una subunidad del dominio Fc, típicamente es por medio de una región bisagra de inmunoglobulina.

50 En un modo de realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab y el

segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En dicho modo de realización, el primer resto de unión a antígeno se puede fusionar en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno o al extremo N de la otra de las subunidades del dominio Fc.

5 En un modo de realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab y el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc. En este modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende esencialmente una molécula de inmunoglobulina, en la que en uno de los brazos Fab las regiones variables de la cadena pesada y ligera VH y VL (o las regiones constantes CH1 y CL en modos de realización en los que no se introducen modificaciones de carga como se describe en el presente documento en los dominios CH1 y CL) se intercambian/reemplazan entre sí (véase la figura 1A, D).

15 En modos de realización alternativos, un tercer resto de unión a antígeno, en particular una tercera molécula Fab, se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización particular de este tipo, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. En este modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende esencialmente una molécula de inmunoglobulina, en la que en uno de los brazos Fab las regiones variables de la cadena pesada y ligera VH y VL (o las regiones constantes CH1 y CL en modos de realización en los que no se introducen modificaciones de carga como se describe en el presente documento en los dominios CH1 y CL) se intercambian/reemplazan entre sí, y en la que una molécula Fab adicional (convencional) se fusiona de forma N terminal a dicho brazo Fab (véase la figura 1B, E). En otro modo de realización de este tipo, el primer y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En este modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende esencialmente una molécula de inmunoglobulina con una molécula Fab adicional fusionada de forma N terminal a uno de los brazos Fab de inmunoglobulina, en la que en dicha molécula Fab adicional las regiones variables de la cadena pesada y ligera VH y VL (o las regiones constantes CH1 y CL en modos de realización en los que no se introducen modificaciones de carga como se describe en el presente documento en los dominios CH1 y CL) se intercambian/reemplazan entre sí (véase la figura 1C, F).

En un modo de realización particular, la molécula de inmunoglobulina comprendida en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención es una inmunoglobulina de clase IgG. En un modo de realización incluso más particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG₁. En otro modo de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG₄.

En un modo de realización particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

- 45 a) una primera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2;
- b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3, y en la 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 reemplazan entre sí;
- 50 c) una tercera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2; y
- d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable; en la que la tercera molécula Fab es idéntica a la primera molécula Fab;
- 55 en la que
- (i) la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la segunda molécula Fab y la tercera molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, o
- 60 (ii) la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la primera molécula Fab y la tercera molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc; y
- 65 en la que la primera molécula Fab y la tercera molécula Fab comprenden una región variable de la cadena pesada,

en particular una región variable de la cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 14, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 15 y la HCDR 3 de SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera, en particular una región variable de la cadena ligera humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 17, la LCDR 2 de SEQ ID NO: 18 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 19.

En otro modo de realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

a) una primera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2;

b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3, y en la 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 reemplazan entre sí;

c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable;

en la que

(i) la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, o

(ii) la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc; y en la que la primera molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada, en particular una región variable de la cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 14, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 15 y la HCDR 3 de SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera, en particular una región variable de la cadena ligera humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 17, la LCDR 2 de SEQ ID NO: 18 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 19.

En otro modo de realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

a) una primera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2;

b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3, y en la 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 reemplazan entre sí;

c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable;

en la que la primera molécula Fab y la segunda molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc; y

en la que la primera molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada, en particular una región variable de la cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 14, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 15 y la HCDR 3 de SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera, en particular una región variable de la cadena ligera humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 17, la LCDR 2 de SEQ ID NO: 18 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 19.

En todas las diferentes configuraciones de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, las sustituciones aminoacídicas descritas en el presente documento, si están presentes, pueden estar en los dominios CH1 y CL de la primera y (si está presente) de la tercera molécula Fab, o bien en los dominios CH1 y CL de la segunda molécula Fab. Preferentemente, están en los dominios CH1 y CL de la primera y (si está presente) la tercera molécula Fab. De acuerdo con el concepto de la invención, si se realizan sustituciones aminoacídicas como se describe en el presente documento en la primera (y, si está presente, en la tercera) molécula Fab, no se realizan dichas sustituciones aminoacídicas en la segunda molécula Fab. Por el contrario, si se realizan sustituciones aminoacídicas como se describe en el presente documento en la segunda molécula Fab, no se realizan dichas sustituciones aminoacídicas en la primera (y, si está presente, en la tercera) molécula Fab. No se realizan sustituciones aminoacídicas en las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que comprenden una molécula Fab en la que los dominios constantes CL y CH1 de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí.

En modos de realización particulares de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, en particular en la que se realizan sustituciones aminoacídicas como se describe en el presente documento en la primera (y, si está presente, en la tercera) molécula Fab, el dominio constante CL de la primera (y, si está presente, la tercera) molécula Fab es de isotipo kappa. En otros modos de realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, en particular en la que se realizan sustituciones aminoacídicas como se describe en el presente documento en la segunda molécula Fab, el dominio constante CL de la segunda molécula Fab es de isotipo kappa. En algunos modos de realización, el dominio constante CL de la primera (y, si está presente, la tercera) molécula Fab y el dominio constante CL de la segunda molécula Fab son de isotipo kappa.

En un modo de realización particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

a) una primera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2;

b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

c) una tercera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2; y

d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable; en la que la tercera molécula Fab es idéntica a la primera molécula Fab;

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

en la que

(i) la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la segunda molécula Fab y la tercera molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, o

(ii) la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la primera molécula Fab y la tercera molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc; y

en la que la primera molécula Fab y la tercera molécula Fab comprenden una región variable de la cadena pesada, en particular una región variable de la cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 14, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 15 y la HCDR 3 de SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera, en particular una región variable de la cadena ligera humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 17, la LCDR 2 de SEQ ID NO: 18 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 19.

En un modo de realización incluso más particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

a) una primera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2;

b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

c) una tercera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2; y

d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable;

en la que la tercera molécula Fab es idéntica a la primera molécula Fab;

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

glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat);

en la que la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la segunda molécula Fab y la tercera molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, o

en la que la primera molécula Fab y la tercera molécula Fab comprenden una región variable de la cadena pesada, en particular una región variable de la cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 14, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 15 y la HCDR 3 de SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera, en particular una región variable de la cadena ligera humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 17, la LCDR 2 de SEQ ID NO: 18 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 19.

En otro modo de realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

a) una primera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2;

b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable;

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

en la que

(i) la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, o

(ii) la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc; y en la que la primera molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada, en particular una región variable de la cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 14, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 15 y la HCDR 3 de SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera, en particular una región variable de la cadena ligera humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 17, la LCDR 2 de SEQ ID NO: 18 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 19.

En otro modo de realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

a) una primera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2;

b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí; y

c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable;

en la que

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

en la que la primera molécula Fab y la segunda molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc; y

en la que la primera molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada, en particular una región variable de la cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 14, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 15 y la HCDR 3 de SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera, en particular una región variable de la cadena ligera humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 17, la LCDR 2 de SEQ ID NO: 18 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 19.

En modos de realización particulares de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG. En un modo de realización específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En otro modo de realización específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄. En un modo de realización incluso más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄ que comprende la sustitución aminoacídica S228P (numeración de Kabat). En modos de realización particulares, el dominio Fc es un dominio Fc humano.

En modos de realización particulares, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización específico de este tipo, un residuo aminoacídico en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando de este modo una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que se puede situar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y un residuo aminoacídico en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la que se puede situar la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad.

En un modo de realización particular, el dominio Fc presenta una afinidad de unión reducida por un receptor Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural. En determinados modos de realización, el dominio Fc se genomanipula para tener afinidad de unión reducida por un receptor Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor Fc y/o la función efectora. En un modo de realización, las una o más sustituciones aminoacídicas en el dominio Fc que reducen la unión a un receptor Fc y/o la función efectora están en una o más posiciones seleccionadas del grupo de L234, L235 y P329 (numeración del índice EU de Kabat). En modos de realización particulares, cada subunidad del dominio Fc comprende tres sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor Fc y/o la función efectora en la que dichas sustituciones aminoacídicas son L234A, L235A y P329G (numeración del índice EU de Kabat). En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular un dominio Fc de IgG₁ humana. En otros modos de realización, cada subunidad del dominio Fc comprende dos sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor Fc y/o la función efectora en la que dichas sustituciones aminoacídicas son L235E y P329G (numeración del índice EU de Kabat). En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄, en particular un dominio Fc de IgG₄ humana. En un modo de realización, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T es un dominio Fc de IgG₄ y comprende las sustituciones aminoacídicas L235E y S228P (SPLE) (numeración del índice EU de Kabat).

En un modo de realización, el receptor Fc es un receptor Fc_γ. En un modo de realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En un modo de realización, el receptor Fc es un receptor Fc activador. En un modo de realización específico, el receptor Fc es Fc_γRIIa, Fc_γRI y/o Fc_γRIIIa humano. En un modo de realización, la función efectora es citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

En un modo de realización específico, de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, el segundo resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 4, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 5, la HCDR 3 de SEQ ID NO: 6, y una región variable de la cadena ligera que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 8, la LCDR 2 de SEQ ID NO: 9 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 10. En un modo de realización incluso más específico, el segundo resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En algunos modos de realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab. En un modo de realización específico, el segundo resto de unión a antígeno, en particular la molécula Fab, comprendido en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 8, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10. En un modo de realización incluso más específico, dicho segundo

resto de unión a antígeno, en particular la molécula Fab, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

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

a) una primera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2;

10 b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3, y en la 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 reemplazan entre sí;

c) una tercera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2; y

15 d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable;

en la que

20 (i) la primera molécula Fab y la tercera molécula Fab comprenden cada una la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 14, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 15, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 17, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 18 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 19, y la segunda molécula Fab comprende la CDR 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 8, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10; y

(ii) la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la segunda molécula Fab y la tercera molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc.

30 En un modo de realización, en la segunda molécula Fab, los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí y además (iii) en el dominio constante CL de la primera molécula Fab y la tercera molécula Fab, el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido de la posición 123 se sustituye por lisina (K) o arginina (R), en particular por arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 del primera molécula Fab y la tercera molécula Fab, el aminoácido de la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

40 De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona uno o más polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención. La invención proporciona además uno o más vectores, en particular el vector de expresión, que comprende el/los polinucleótido(s) aislado(s) de la invención, y una célula huésped que comprende el/los polinucleótido(s) o el/los vector(es) aislado(s) de la invención. En algunos modos de realización, la célula huésped es una célula eucariota, en particular una célula de mamífero.

45 En otro aspecto se proporciona un procedimiento de producción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención, que comprende las etapas de a) cultivar la célula huésped de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y b) recuperar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T. La invención también engloba una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T producida por el procedimiento de la invención.

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

55 También se engloban por la invención procedimientos de uso de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y la composición farmacéutica de la invención. En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o una composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento. En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesita el mismo. En un modo de realización específico, la enfermedad es cáncer. En cualquiera de los modos de realización anteriores, el individuo preferentemente es un mamífero, en particular un ser humano.

65

Breve descripción de los dibujos

- FIGURA 1. Configuraciones ejemplares de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T (TCB) de la invención. (A, D) Ilustración de la molécula "1+1 CrossMab". (B, E) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con orden alternativo 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 alternativo 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 y orden alternativo 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 promueve la heterodimerización. ++, --: aminoácidos de cargas opuestas introducidos opcionalmente en los dominios CH1 y CL. Las moléculas Crossfab se representan como que comprenden un intercambio de regiones VH y VL, pero pueden comprender, en modos de realización en los que no se introducen modificaciones de carga en los dominios CH1 y CL, de forma alternativa un intercambio de los dominios CH1 y CL.
- FIGURA 2. Ilustración de las TCB preparadas en los ejemplos. (A) Ilustración de la molécula TCB anti-p95HER2/anti-CD3 "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en la proteína fijadora de CD3, modificación de carga en la proteína fijadora de p95HER2, molécula A). (B) Ilustración de la molécula TCB anti-p95HER2/anti-CD3 "2+1 IgG CrossFab, invertida" sin modificaciones de carga (intercambio CH1/CL en la proteína fijadora de CD3, molécula B). EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K.
- FIGURA 3. Análisis CE-SDS de las moléculas TCB preparadas en los ejemplos (preparaciones purificadas finales). (A) Electroferograma de "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en la proteína fijadora de CD3, modificación de carga en la proteína fijadora de p95HER2; molécula A). (B) Electroferograma de la molécula TCB anti-p95HER2/anti-CD3 "2+1 IgG CrossFab, invertida" sin modificaciones de carga (intercambio CH1/CL en la proteína fijadora de CD3, molécula B). Carril A = no reducida, carril B = reducida.
- FIGURA 4. SDS PAGE no reducida de fracciones de cromatografía con proteína A de la molécula TCB A preparada en el ejemplo 1 (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage (Invitrogen); teñido con Coomassie; carril 1 = marcador de tamaño Mark 12 (Invitrogen)); carriles de 2 a 7: fracciones de cromatografía con proteína A de la molécula A.
- FIGURA 5. (A) Inmuno-electrotransferencia de células MCF10A que expresan de forma estable el vector, p95HER2, HER2 o la combinación. (B) Las células mostradas en (A) se incubaron con 2 µg/ml de TCB para p95HER2 y se analizaron por citometría de flujo. (C) Comparación de los niveles de expresión de p95HER2 en células MCF10A que expresan de forma estable p95HER2 ("MCF10A_p95Her2") y células HCC-1954 analizadas por citometría de flujo.
- FIGURA 6. Lisis de células MCF10A que expresan de forma estable el vector, p95HER2, HER2 o la combinación después de 48 horas de incubación con PBMC (proporción efectora:diana 10:1) y concentraciones crecientes de anticuerpo TCB frente a p95HER2 ("p95-TCB").
- FIGURA 7. Lisis de células MCF10A (A, B) que expresan de forma estable p95HER2 (A) o vector (B) o (C) células HCC-1954, después de la incubación durante 46 horas con PBMC (proporción efectora:diana 10:1) y concentraciones crecientes de TCB para p95HER2 o TCB de control no dirigida.
- FIGURA 8. Expresión de CD25 (A, B) y CD69 (C, D) en linfocitos T CD4+ tras la destrucción de células MCF10A que expresan p95HER2 o vector, o células HCC-1954 después de 46 horas mediada por TCB para p95HER2, analizada por citometría de flujo. (A, C) Intensidad de fluorescencia media (MFI), (B, D) % de linfocitos T CD4+ positivos.
- FIGURA 9. Expresión de CD25 (A, B) y CD69 (C, D) en linfocitos T CD8+ tras la destrucción de MCF10A que expresan p95HER2 o vector o HCC-1954 después de 46 horas mediada por TCB para p95HER2, analizada por citometría de flujo. (A, C) Intensidad de fluorescencia media (MFI), (B, D) % de linfocitos T CD8+ positivos.
- FIGURA 10. Unión de p95HER2-TCB, HER2-TCB y TCB de control no dirigida en MCF10A_p95HER2, MCF10A_Vector, MCF10A_HER2 y cardiomiocitos analizados por citometría de flujo.
- FIGURA 11. Estimulación con CD3 de células Jurkat NFAT mediada por TCB para p95HER2 o TCB para HER2 en presencia de cardiomiocitos.
- FIGURA 12. Lisis de células MCF10A que expresan de forma estable p95HER2 (MCF10A-p95Her2) o HER2 (MCF10A-Her2) y cardiomiocitos después de la incubación durante ~48 horas con PBMC (proporción efectora:diana 10:1) y con concentraciones crecientes de TCB para p95HER2 o TCB para HER2.
- FIGURA 13. Nivel de expresión de CD25 en linfocitos T CD8+ (A) y CD4+ (B) tras la lisis de MCF10A-p95HER2 o MCF10A-HER2 y cardiomiocitos después de la incubación durante ~48 horas con PBMC (proporción

efectora:diana 10:1) y concentraciones crecientes de TCB para p95HER2 o TCB para HER2.

FIGURA 14. (A) Inmunohistoquímica con anticuerpo frente a p95HER2 de los xenoinjertos derivados del paciente (PDX) positivos para p95HER2 (PDX67) y negativos para p95HER2 (PDX118) a partir de los que se generaron cultivos primarios. (B) Los cultivos primarios de PDX mostrados en (A) y de un PDX de cáncer de mama triple negativo (CMTN) se incubaron con 2 µg/ml de p95HER2-TCB y se analizaron por citometría de flujo. (C) Los cultivos primarios de PDX en (A) se incubaron con PBMC (proporción efectora:diana 10:1) y con concentraciones crecientes de TCB para p95HER2 durante 48 horas. La lisis celular se determinó por liberación de LDH.

FIGURA 15. (A) Flujo de trabajo experimental para pruebas *in vivo* de TCB para p95HER2. PDX173, p95HER2+, se implantó en el cuerpo adiposo mamario de ratones NSG. Cuando los tumores alcanzaron una media de 200 mm³ se humanizaron los animales con 10⁷ PBMC recién aisladas y se aleatorizaron en los 4 grupos experimentales. Los tratamientos comenzaron 48 h después de la inyección de PBMC. (B) Media del cambio porcentual en el volumen del tumor para cada uno de los grupos experimentales y para animales individuales. (C y D) Pesos de los tumores al final del experimento, prueba de la *t*, **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001; ns, no significativo.

FIGURA 16. (A) Determinación de células inmunitarias infiltrantes de tumor. Se extirparon los tumores y se tiñeron suspensiones de células individuales con una mezcla de anticuerpos que contenía: msCD45, huCD45 (A), huCD3 (B), huCD8 (C) y huCD4 (D). Las muestras se analizaron por citometría de flujo, prueba de la *t*, **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001; ns, no significativo. (E) Porcentaje de huCD8 en muestras de tumor FFPE determinado por análisis inmunohistoquímico.

FIGURA 17. Efecto de TCB para p95HER2 sobre el crecimiento de xenoinjertos de células que expresan p95HER2. (A-C) Las células MCF7 se transdujeron de forma estable con p95HER2 bajo el control de un promotor inducible por doxiciplina y un ARNhc no dirigido (sh-NT) o un ARNhc dirigido a p21 (sh-p21) bajo el control de un promotor inducible por doxiciplina independiente. Los lisados celulares se evaluaron por inmunoelectrotransferencia (A) y se realizaron ensayos de proliferación (B). En (C) se muestran imágenes de campo claro representativas de las células. (D) Se les inyectaron a ratones NSG (n=6 por grupo) 10⁶ células con sh-p21 de MCF7 Tet-On p95HER2. Cuando los tumores alcanzaron ~200 mm³ (sombreado), se transfirieron PBMC humanas de un voluntario sano por inyección i.p. (10⁷ células/ratón). Los ratones se trataron con vehículo (control) o 1 mg/kg de TCB para p95HER2 (flechas). Se midieron los volúmenes de los tumores con un compás calibrador. Los gráficos muestran promedios; las barras de error corresponden a intervalos de confianza de un 95 %. Los valores de *p* se calcularon usando la prueba de la *t* de Student bilateral; **p*<0,05, ***p*<0,01. (E) Niveles de CD45⁺ humana después de la inyección de PBMC. Se obtuvieron leucocitos de los ratones analizados en (D) 15 días después de la inyección de PBMC, se tiñeron con anti-huCD45 y se cuantificaron por citometría de flujo. Los diagramas de cajas muestran el porcentaje de células CD45⁺ en los ratones analizados en (D). Los bigotes más bajos y más altos indican los percentiles 10 y 90, respectivamente; los bordes inferiores y superiores de la caja indican los percentiles 25 y 75, respectivamente; la línea interna en la caja indica el percentil 50. (F) Efecto de TCB para p95HER2 sobre el peso del tumor. Al final del experimento mostrado en (D), los tumores se extirparon y se pesaron. Los resultados se expresan como promedios; las barras de error corresponden a intervalos de confianza de un 95 %. Los valores de *p* se calcularon usando la prueba de la *t* de Student bilateral; **p* < 0,05.

FIGURA 18. Efecto de TCB para p95HER2 sobre el crecimiento de un xenoinjerto derivado del paciente (PDX) positivo para p95HER2. (A) Análisis de la expresión de p95HER2 por inmunohistoquímica en el PDX usado para el estudio. (B) Efecto de TCB para p95HER2 sobre el crecimiento del tumor. Se supervisaron ratones NSG (n=6 por grupo) que llevaban el PDX indicado hasta que los tumores alcanzaron ~300 mm³ (sombreado). A continuación, se transfirieron PBMC humanas de un voluntario sano por inyección i.p. (10⁷ células/ratón). Los ratones se trataron con vehículo (control) o 1 mg/kg de TCB para p95HER2 (flechas). Se midieron los volúmenes de los tumores con un compás calibrador. Los gráficos muestran promedios; las barras de error corresponden a intervalos de confianza de un 95 %. Los valores de *p* se calcularon usando la prueba de la *t* de Student bilateral; **p* < 0,05. (C) Niveles de CD45⁺ humana después de la inyección de PBMC. Se obtuvieron leucocitos de los ratones analizados en (B) 15 días después de la inyección de PBMC, se tiñeron con anti-huCD45 y se cuantificaron por citometría de flujo. Los diagramas de cajas muestran el porcentaje de células CD45⁺ en los ratones analizados en (B). Los bigotes más bajos y más altos indican los percentiles 10 y 90, respectivamente; los bordes inferiores y superiores de la caja indican los percentiles 25 y 75, respectivamente; la línea interna en la caja indica el percentil 50. (D) Efecto de TCB para p95HER2 sobre el peso del tumor. Al final del experimento mostrado en (B), los tumores se extirparon y se pesaron. Los resultados se expresan como promedios; las barras de error corresponden a intervalos de confianza de un 95 %. Los valores de *p* se calcularon usando la prueba de la *t* de Student bilateral; **p* < 0,05. (E) Efecto de TCB para p95HER2 sobre la infiltración de linfocitos T. Al final del experimento mostrado en (B), las muestras de tumor correspondientes al experimento mostrado en (B) se desagregaron en células individuales, se tiñeron con anti-CD3, CD8 y CD4 humanas, y se cuantificó el número de células positivas por citometría de flujo. Los diagramas de cajas muestran el porcentaje de las células positivas para el marcador indicado. Los bigotes más bajos y más altos indican los percentiles 10 y 90, respectivamente; los bordes inferiores y superiores de la caja indican los percentiles 25 y 75, respectivamente; la línea interna en la caja indica el percentil 50. Los valores de *p* se calcularon usando la prueba de la *t* de Student bilateral; **p* < 0,05, ***p* < 0,01. (F) Efecto de TCB para p95HER2 sobre células tumorales. Al final del experimento mostrado en (B), se tiñeron cortes sagitales de tumores con anticuerpos anti-

citoqueratina humana y se cuantificó el % de células positivas. Los resultados se expresan como promedios; las barras de error corresponden a intervalos de confianza de un 95 %. Los valores de p se calcularon usando la prueba de la t de Student bilateral; *** $p < 0,001$. Las tinciones representativas se muestran en (G).

5 FIGURA 19. Activación de linfocitos T inducida por TCB para HER2 y TCB para p95HER y lisis de células tumorales. (A, B) Se incubaron células MCF10A y células MCF7 con concentraciones crecientes de TCB para HER2 (A) o TCB para p95HER2 (B) y con PBMC en una proporción de 10:1. Después de 48 h, se recogieron los sobrenadantes y se midió la lisis por liberación de LDH. (C) Se recogieron PBMC de MCF10A-vector en (A) y (B), se tiñeron para huCD45/CD8/CD4/CD69/CD25 y se analizaron por citometría de flujo. El gráfico representa la
10 media de tres experimentos independientes y muestra el porcentaje de células CD8 o CD4 que son positivas para los marcadores de activación CD25 o CD69.

FIGURA 20. (A) Los lisados de células MCF10A transfectadas con HER2 natural o HER2 que portaba una mutación M611A se analizaron por inmunoelectrotransferencia con anticuerpos anti-HER2. (B) Las mismas células que en
15 (A) se analizaron por citometría de flujo con los anticuerpos indicados.

Descripción detallada

La divulgación técnica detallada que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá de la divulgación de la invención *per se*, y también puede proporcionar antecedentes técnicos para desarrollos técnicos relacionados. Se apreciará que los antecedentes técnicos adicionales proporcionados no están destinados a definir la invención como tal (que se define por las reivindicaciones adjuntas), sino más bien a colocarla en un contexto técnico más amplio. En consecuencia, se apreciará que los términos "modos de realización" o "aspectos" reflejan detalles específicos de la divulgación, pero en la medida en que se refieren a una parte de los antecedentes técnicos adicionales no se pretende definir como parte de la materia objeto de la invención que no se encuentra dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

A) Definiciones

30 Los términos se usan en el presente documento como se usan en general en la técnica, a menos que se defina de otro modo en lo que sigue.

Como se usa en el presente documento, el término "molécula de unión a antígeno" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Los ejemplos de moléculas de
35 unión a antígeno son inmunoglobulinas y derivados, por ejemplo, fragmentos, de las mismas.

El término "biespecífica" quiere decir que la molécula de unión a antígeno se puede unir específicamente a al menos dos determinantes antigénicos distintos. Típicamente, una molécula de unión a antígeno biespecífica comprende dos sitios de unión a antígeno, de los que cada uno es específico para un determinante antigénico diferente. En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica se puede unir simultáneamente a dos determinantes antigénicos, en particular dos determinantes antigénicos expresados en dos células distintas.

El término "valente" como se usa en el presente documento indica la presencia de un número especificado de sitios de unión a antígeno en una molécula de unión a antígeno. Como tal, el término "unión monovalente a un antígeno" indica 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 aminoacídicos, de una molécula de unión a antígeno que proporciona interacción con el antígeno. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo comprende residuos aminoacídicos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Una molécula de inmunoglobulina natural típicamente tiene dos sitios de unión a antígeno, una molécula Fab típicamente tiene un único sitio de unión a antígeno.

Como se usa en el presente documento, el término "resto de unión a antígeno" se refiere a una molécula polipeptídica que se une específicamente a un determinante antigénico. En un modo de realización, un resto de unión a antígeno puede dirigir la entidad a la que se fija (por ejemplo, un segundo resto 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 otro modo de realización, un resto de unión a antígeno puede activar la señalización a través de su antígeno diana, por ejemplo, un antígeno del complejo receptor de linfocitos T. Los restos de unión a antígeno incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos, como se define además en el presente documento. Los restos de unión a antígeno particulares incluyen un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprende una región variable de la cadena pesada del anticuerpo y una región variable de la cadena ligera del anticuerpo. En determinados modos de realización, los restos de unión a antígeno pueden comprender regiones constantes de anticuerpo, como se define además en el presente documento y es conocido en la técnica. Las regiones constantes de la cadena pesada útiles incluyen cualquiera de los cinco isotipos: α , δ , ϵ , γ o μ . Las regiones constantes de la

cadena ligera útiles incluyen cualquiera de los dos isotipos: κ y λ .

Como se usa en el presente documento, el término "determinante antigénico" es sinónimo de "antígeno" y "epítipo" y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional compuesta por diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une un resto de unión a antígeno, formando un complejo de resto de unión a antígeno-antígeno. Los determinantes antigénicos útiles se pueden encontrar, por ejemplo, en las superficies de células tumorales, en las superficies de células infectadas por virus, en las superficies de otras células afectadas, en la superficie de células inmunitarias, libres en suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (MEC). Las proteínas denominadas antígenos en el presente documento (por ejemplo, CD3) pueden ser cualquier forma natural 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 de otro modo. En un modo de realización particular, el antígeno es una proteína humana. Cuando se hace referencia a una proteína específica en el presente documento, el término engloba la proteína no procesada "de longitud completa" así como cualquier forma de la proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de la proteína, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Una proteína humana ejemplar útil como antígeno es CD3, en particular la subunidad épsilon de CD3 (véase UniProt n.º P07766 (versión 130), NCBI RefSeq n.º NP_000724.1, SEQ ID NO: 1 para la secuencia humana; o UniProt n.º Q95L15 (versión 49), NCBI GenBank n.º BAB71849.1, SEQ ID NO: 2 para la secuencia de macaco cangrejero [*Macaca fascicularis*] o p95HER2 (véase a continuación). En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención se une a un epítipo de CD3 o p95HER2 que se conserva entre los antígenos CD3 o p95HER2 de diferentes especies. En modos de realización particulares, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención se une al CD3 humano y al p95HER2 humano.

El protooncogén HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) codifica una proteína tirosina cinasa (p185HER2) que está relacionada y es en cierto modo homóloga al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (véase Coussens, L. *et al.*, Science 230:1132-1139 (1985); Yamamoto, T. *et al.*, Nature 319:230-234 (1986); King, C. R. *et al.*, Science 229:974-976 (1985)). HER2 también es conocido en el campo como c-erbB-2 y, a veces, con el nombre del homólogo de rata, neu. La amplificación y/o sobreexpresión de HER2 está asociada con múltiples neoplasias malignas humanas y parece estar íntegramente implicada en la progresión de un 25-30 % de los cánceres de mama y ovario humanos (Slamon, D. J. *et al.*, Science 235:177-182 (1987), Slamon, D. J. *et al.*, Science 244:707-712 (1989)). Además, el grado de amplificación se correlaciona inversamente con la mediana de tiempo de supervivencia del paciente observado (Slamon, *supra*, Science 1989).

El término "p95HER2", como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento carboxiterminal (CTF) de la proteína receptora HER2, que también es conocida como "611-CTF" o "p95HER2 de 100-115 kDa". El fragmento p95HER2 se genera en la célula a través del inicio de la traducción del ARNm de HER2 en la posición del codón 611 de la molécula de HER2 de longitud completa (Anido *et al.*, EMBO J 25; 3234-44 (2006)). Tiene un peso molecular de 100 a 115 kDa y se expresa en la membrana celular, donde puede formar homodímeros mantenidos por enlaces disulfuro intermoleculares (Pedersen *et al.*, Mol Cell Biol 29, 3319-31 (2009)). En SEQ ID NO: 30 se da una secuencia ejemplar de p95HER2 humano.

Por "unión específica" se entiende que la unión es selectiva para el antígeno y se puede discriminar de las interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de un resto de unión a antígeno para unirse a un determinante antigénico específico se puede medir a través de un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas consabidas para un experto en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (RPS) (analizada, por ejemplo, en un instrumento BIAcore) (Liljeblad *et al.*, Glyco J 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En un modo de realización, el grado de unión de un resto de unión a antígeno a una proteína no relacionada es menos de aproximadamente un 10 % de la unión del resto de unión a antígeno al antígeno como se mide, por ejemplo, por RPS. En determinados modos de realización, un resto de unión a antígeno que se une al antígeno, o una molécula de unión a antígeno que comprende ese resto de unión a antígeno, tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un receptor) y su compañero de unión (por ejemplo, un ligando). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, un resto de unión a antígeno y un antígeno, o un receptor y su ligando). La afinidad de una molécula X por su compañera Y se puede representar en general por la constante de disociación (K_D), que es la proporción de las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_{dis} y k_{as} , respectivamente). Por tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre que la proporción de las constantes de velocidad permanezca igual. La afinidad se puede medir por procedimientos bien establecidos conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Un procedimiento particular para medir la afinidad es la resonancia de plasmón superficial (RPS).

"Unión reducida", por ejemplo unión reducida a un receptor Fc, se refiere a una disminución en la afinidad para la interacción respectiva, como se mide, por ejemplo, por RPS. Por claridad, el término incluye también la reducción de la afinidad hasta cero (o por debajo del límite de detección del procedimiento analítico), es decir, la supresión completa de la interacción. Por el contrario, "unión incrementada" se refiere a un incremento en la afinidad de unión para la interacción respectiva.

Un "antígeno activador de linfocitos T" como se usa en el presente documento se refiere a un determinante antigénico expresado en la superficie de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, que puede inducir la activación de linfocitos T tras la interacción con una molécula de unión a antígeno. Específicamente, la interacción de una molécula de unión a antígeno con un antígeno activador de linfocitos T puede inducir la activación de linfocitos T desencadenando la cascada de señalización del complejo receptor de linfocitos T. De acuerdo con la invención, el antígeno activador de linfocitos T es CD3, en particular la subunidad épsilon de CD3 (véase UniProt n.º P07766 (versión 130), NCB1 RefSeq n.º NP_000724.1, SEQ ID NO: 1 para la secuencia humana; o UniProt n.º Q95L15 (versión 49), NCBI GenBank n.º BAB71849.1, SEQ ID NO: 2 para la secuencia de macaco cangrejero [*Macaca fascicularis*]).

"Activación de linfocitos T" como se usa en el presente documento se refiere a una o más respuestas celulares de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, seleccionadas de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención pueden inducir la activación de linfocitos T. Los ensayos adecuados para medir la activación de linfocitos T son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento.

Un "antígeno de célula diana" como se usa en el presente documento se refiere a un determinante antigénico presentado en la superficie de una célula diana, por ejemplo, una célula en un tumor tal como una célula cancerosa o una célula del estroma tumoral. De acuerdo con la invención, el antígeno de célula diana es p95HER2, en particular p95HER2 humano.

Como se usa en el presente documento, los términos "primero", "segundo" o "tercero" con respecto a las moléculas Fab, etc., se usan por conveniencia para distinguir cuando hay más de uno de cada tipo de resto. El uso de estos términos no pretende conferir un orden u orientación específicos de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T a menos que se establezca explícitamente así.

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

Por "fusionado" se entiende que los componentes (por ejemplo, una molécula Fab y una subunidad de dominio Fc) se unen por enlaces peptídicos, directamente o bien por medio de uno o más conectores peptídicos.

Como se usa en el presente documento, el término "monocatenaria" se refiere a una molécula que comprende monómeros de aminoácidos unidos linealmente por enlaces peptídicos. En determinados modos de realización, uno de los restos de unión a antígeno es una molécula Fab monocatenaria, es decir, una molécula Fab en la que la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab están conectadas por un conector peptídico para formar una única cadena peptídica. En un modo de realización particular de este tipo, el extremo C de la cadena ligera de Fab se conecta al extremo N de la cadena pesada de Fab en la molécula Fab monocatenaria.

Por molécula Fab "entrecruzada" (también denominada "Crossfab") se entiende una molécula Fab en la que los dominios variables o los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de Fab se intercambian (es decir, se reemplazan entre sí), es decir, la molécula Fab entrecruzada comprende una cadena peptídica compuesta por el dominio variable de la cadena ligera VL y el dominio constante de la cadena pesada 1 CH1 (VL-CH1, en sentido N a C terminal), y una cadena peptídica compuesta por el dominio variable de la cadena pesada VH y el dominio constante de la cadena ligera CL (VH-CL, en sentido N a C terminal). Por claridad, en una molécula Fab entrecruzada en la que los dominios variables de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian, la cadena peptídica que comprende el dominio constante de la cadena pesada 1 CH1 se denomina en el presente documento "cadena pesada" de la molécula Fab (entrecruzada). Por el contrario, en una molécula Fab entrecruzada en la que los dominios constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian, la cadena peptídica que comprende el dominio variable de la cadena pesada VH se denomina en el presente documento "cadena pesada" de la molécula Fab (entrecruzada).

Por el contrario a esto, por una molécula Fab "convencional" se entiende una molécula Fab en su formato natural, es decir, que comprende una cadena pesada compuesta por los dominios variable y constante de la cadena pesada (VH-CH1, en sentido N a C terminal), y una cadena ligera compuesta por los dominios variable y constante de la cadena ligera (VL-CL, en sentido N a C terminal).

El término "molécula de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que tiene la estructura de un anticuerpo natural.

Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase IgG son glucoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que están unidas con enlaces disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH), también llamado dominio pesado variable o región variable de la cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también llamados región constante de la cadena pesada. De forma similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL), también llamado dominio ligero variable o región variable de la cadena ligera, seguido de un dominio constante ligero (CL), también llamado región constante de la cadena ligera. La cadena pesada de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de cinco tipos, llamados α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), de los que algunos se pueden dividir además 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 se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina consiste esencialmente en dos moléculas Fab y un dominio Fc, unidos por medio de la región bisagra de inmunoglobulina.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv) y anticuerpos de dominio único. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plückerthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); véanse también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos del epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 404.097; 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). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo pero sin limitarse a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

El término "dominio de unión a antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria a parte o la totalidad de un antígeno. Se puede proporcionar un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, por uno o más dominios variables de anticuerpo (también llamados regiones variables de anticuerpo). En particular, un dominio de unión a antígeno comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural en general tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt *et al.*, Kuby Immunology, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, 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"). En general, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden en general residuos aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), siendo las últimas las de variabilidad de secuencia más alta y/o estando implicadas en el reconocimiento antigénico. Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden en general los residuos aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las regiones hipervariables (HVR) también se denominan "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), y estos términos se usan en el presente documento de manera intercambiable en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región particular se ha descrito por Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y por Chothia *et al.*, J Mol Biol 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen la superposición o subconjuntos de residuos aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de

un anticuerpo o variantes del mismo esté dentro del alcance del término como se define y se usa en el presente documento. Los residuos aminoacídicos apropiados que engloban las CDR como se define por cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen a continuación en la tabla A como comparación. Los números de residuos exactos que engloba una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de forma rutinaria qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo. Las secuencias de CDR dadas en el presente documento en general están de acuerdo con la definición de Kabat.

TABLA A. Definiciones de CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
CDR1 en V _H	31-35	26-32	26-35
CDR2 en V _H	50-65	52-58	50-58
CDR3 en V _H	95-102	95-102	95-102
CDR1 en V _L	24-34	26-32	24-34
CDR2 en V _L	50-56	50-52	50-56
CDR3 en V _L	89-97	91-96	89-97

¹ La numeración de todas las definiciones de CDR en la tabla A es de acuerdo con las convenciones de numeración expuestas por Kabat *et al.*, (véase a continuación).

² "AbM" con una "b" minúscula, como se usa en la tabla A, se refiere a las CDR como se define por el programa informático de modelado de anticuerpos "AbM" de Oxford Molecular.

Kabat *et al.*, también definieron un sistema de numeración para las secuencias de la región variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de la región variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en el presente documento en relación con secuencias de regiones variables, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). A menos que se especifique de otro modo, las referencias a la numeración de posiciones de residuos aminoacídicos específicas en una región variable de anticuerpo son de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Como se usa en el presente documento, las posiciones aminoacídicas de todas las regiones y dominios constantes de la cadena pesada y ligera se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat descrito en Kabat, *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y se denomina "numeración de acuerdo con Kabat" o "numeración de Kabat" en el presente documento. Específicamente el sistema de numeración de Kabat (véanse las páginas 647-660 de Kabat, *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) se usa para el dominio constante de la cadena ligera CL del isotipo kappa y lambda y el sistema de numeración del índice EU de Kabat (véanse las páginas 661-723) se usa para los dominios constantes de la cadena pesada (CH1, bisagra, CH2 y CH3), lo que se aclara además en el presente documento refiriéndose a la "numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat" en este caso.

Las secuencias polipeptídicas del listado de secuencias no se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, está dentro de la habilidad del experto en la técnica convertir la numeración de las secuencias del listado de secuencias a la numeración de Kabat.

"Región estructural" o "FR" se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste en general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen en general en el siguiente orden en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácido de HVR no humanas y residuos de aminoácido de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Dichos dominios variables se denominan en el presente documento "región variable humanizada". Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. En algunos modos de realización se sustituyen algunos residuos de FR de un anticuerpo humanizado por los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha

sometido a humanización. Otras formas de "anticuerpos humanizados" son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente de la del anticuerpo original para generar las propiedades descritas en el presente documento, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o la unión del receptor Fc (FcR).

5 La "clase" de un anticuerpo o inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

10

El término "dominio Fc" o "región Fc" se usa en el presente documento para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente por extenderse desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, los anticuerpos producidos por células huésped pueden experimentar escisión postraducciona de uno o más, en particular uno o dos, aminoácidos del extremo C de la cadena pesada. Por lo tanto, un anticuerpo producido por una célula huésped por expresión de una molécula de ácido nucleico específica que codifica una cadena pesada de longitud completa puede incluir la cadena pesada de longitud completa, o puede incluir una variante escindida de la cadena pesada de longitud completa (también denominada en el presente documento una "cadena pesada variante escindida"). Este puede ser el caso cuando los dos aminoácidos C terminales finales de la cadena pesada son glicina (G446) y lisina (K447, numeración de acuerdo con 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 pueden estar presentes o no. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas incluyendo los dominios Fc (o una subunidad de un dominio Fc como se define en el presente documento) se indican en el presente documento sin el dipéptido glicina-lisina C terminal, si no se indica de otro modo. Una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento, comprendida en una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, puede comprender un dipéptido glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento, comprendida en una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, puede comprender un residuo de glicina C terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Las composiciones como se describe en el presente documento, tales como las composiciones farmacéuticas de la invención, comprenden una población de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención. La población de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T puede comprender moléculas que tienen una cadena pesada de longitud completa y moléculas que tienen una cadena pesada variante escindida. La población de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T puede consistir en una mezcla de moléculas que tienen una cadena pesada de longitud completa y moléculas que tienen una cadena pesada variante escindida, en la que al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T tienen una cadena pesada variante escindida. Una composición que comprende una población de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención puede comprender una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento con un dipéptido glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Una composición que comprende una población de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención puede comprender una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento con un residuo de glicina C terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Una composición de este tipo puede comprender una población de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T comprendidas de moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento; moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento con un residuo de glicina C terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de dominio Fc como se especifica en el presente documento con un dipéptido glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de residuos aminoácidos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, MD, 1991 (véase también anteriormente). Una "subunidad" de un dominio Fc como se usa en el presente documento se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes C terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, que puede crear una autoasociación estable. Por ejemplo, una subunidad de un dominio Fc de IgG comprende un dominio constante CH2 de IgG y uno CH3 de IgG.

65

Una "modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc" es una

manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones postraduccionales de una subunidad del dominio Fc que reduce o evita la asociación de un polipéptido que comprende la subunidad del dominio Fc con un polipéptido idéntico para formar un homodímero. Una modificación que promueve la asociación como se usa en el presente documento en particular incluye modificaciones separadas realizadas en cada una de las dos subunidades del dominio Fc que se desean asociar (es decir, la primera y la segunda subunidad del dominio Fc), en la que las modificaciones son complementarias entre sí para promover la asociación de las dos subunidades del dominio Fc. Por ejemplo, una modificación que promueve la asociación puede alterar la estructura o carga de una o ambas de las subunidades del dominio Fc para hacer que su asociación sea estérica o electrostáticamente favorable, respectivamente. Por tanto, se produce (hetero)dimerización entre un polipéptido que comprende la primera subunidad del dominio Fc y un polipéptido que comprende la segunda subunidad del dominio Fc, que puede ser no idéntico en el sentido de que otros componentes fusionados a cada una de las subunidades (por ejemplo, restos de unión a antígeno) no son los mismos. En algunos modos de realización, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación aminoacídica en el dominio Fc, específicamente una sustitución aminoacídica. En un modo de realización particular, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación aminoacídica separada, específicamente una sustitución aminoacídica, en cada una de las dos subunidades del dominio Fc.

El término "funciones efectoras" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión a receptor Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, captación de antígenos mediada por el complejo inmunitario por células presentadoras de antígenos, regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

Como se usa en el presente documento, se considera que los términos "genomanipular, genomanipulado, genomanipulación" incluyen cualquier manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones postraduccionales de un polipéptido natural o recombinante o fragmento del mismo. La genomanipulación incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glucosilación o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de estos enfoques.

El término "mutación aminoacídica", como se usa en el presente documento, se entiende que engloba sustituciones, deleciones, inserciones y modificaciones aminoacídicas. Cualquier combinación de sustitución, deleción, inserción y modificación se puede realizar para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión reducida a un receptor Fc o asociación incrementada con otro péptido. Las deleciones e inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen deleciones e inserciones de aminoácidos amino y/o carboxiterminales. Las mutaciones aminoacídicas particulares son sustituciones aminoacídicas. Con el propósito de alterar, por ejemplo, las características de unión de una región Fc, son en particular preferentes las sustituciones aminoacídicas no conservadoras, es decir, el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas diferentes. Las sustituciones aminoacídicas incluyen el reemplazo por aminoácidos no naturales o por derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina, 5-hidroxilisina). Se pueden generar mutaciones aminoacídicas usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis dirigida al sitio, PCR, síntesis génica y similares. Se contempla que también pueden ser útiles procedimientos de alteración del grupo de cadena lateral de un aminoácido por procedimientos distintos de genomanipulación, tales como modificación química. Se pueden usar diversas designaciones en el presente documento para indicar la misma mutación aminoacídica. Por ejemplo, se puede indicar una sustitución de prolina en la posición 329 del dominio Fc a glicina como 329G, G329, G₃₂₉, P329G o Pro329Gly.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta por monómeros (aminoácidos) unidos linealmente por 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. Por tanto, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos" o cualquier otro término usado para referirse a una cadena de dos o más aminoácidos se incluyen dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede usar en lugar de, o de manera intercambiable con, cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, incluyendo sin limitación, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido se puede derivar de una fuente biológica natural o producir por tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Se puede generar de cualquier manera, incluyendo por síntesis química. Un polipéptido puede tener un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1000 o más o 2000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no tienen necesariamente dicha estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes, se denominan

desplegados.

Por polipéptido "aislado" o variante o derivado del mismo se pretende un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado se puede retirar de su entorno natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células huésped se consideran aislados para los propósitos de la presente divulgación, ya que son polipéptidos naturales o recombinantes que se han separado, fraccionado o parcial o sustancialmente purificado mediante cualquier técnica adecuada.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían. En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que se puede parafrasear de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

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

donde X es el número de residuos aminoacídicos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos aminoacídicos en B. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa de ordenador ALIGN-2. El término "polinucleótido" se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN derivado de virus o ADN de plásmido (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en los ácidos peptidonucleicos (APN)). El término "molécula de ácido nucleico" se refiere a cualquiera de uno o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

Por molécula de ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se pretende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN que se ha retirado de su entorno natural. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido contenido en un vector se considera aislado para los propósitos de la presente invención. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterógenas o polinucleótidos (parcial o sustancialmente) purificados en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula polinucleotídica contenida en células que contienen normalmente la molécula polinucleotídica, pero la molécula polinucleotídica está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural. Las moléculas de ARN aislado incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro*, así como formas de hebra positiva y negativa, y formas bicatenarias. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente invención 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, sitio de unión a ribosoma o un finalizador de la transcripción.

Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia, se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia polinucleotídica 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 tiene una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia se puede deletar o sustituir con otro nucleótido, o un número de nucleótidos hasta un 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Como cuestión práctica, se puede determinar de forma convencional si cualquier secuencia polinucleotídica particular es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos usando programas informáticos conocidos, tales como los analizados anteriormente para los polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

"Polinucleótido (o ácido nucleico) aislado que codifica [por ejemplo, una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención]" se refiere a una o más moléculas polinucleotídicas que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo (o fragmentos del mismo), incluyendo dicha(s) molécula(s) polinucleotídica(s) en un único vector o vectores separados, y dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

El término "casete de expresión" se refiere a un polinucleótido generado de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plástido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y un promotor. En determinados modos de realización, el casete de expresión comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

El término "vector" o "vector de expresión" es sinónimo de "construcción de expresión" y se refiere a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que se asocia de forma funcional en una célula. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha 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 que el vector de expresión está en el interior de la célula, la molécula de ácido ribonucleico o proteína que se codifica por el gen se produce por el mecanismo de transcripción y/o traducción celular. En un modo de realización, el vector de expresión de la invención comprende un casete de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas" que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pasajes. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento. Una célula huésped es cualquier tipo de sistema celular que se puede usar para generar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente invención. Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, tales como células CHO, células HEK, 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, por nombrar solo unas pocas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado.

Un "receptor Fc activador" es un receptor Fc que después del acoplamiento por un dominio Fc de un anticuerpo provoca acontecimientos de señalización que estimulan a la célula portadora del receptor para que realice funciones efectoras. Los receptores Fc activadores humanos incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89).

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo inmunitario que da lugar a la lisis de células diana recubiertas de anticuerpo por células efectoras inmunitarias. Las células diana son células a las que se unen específicamente anticuerpos o derivados de los mismos que comprenden una región Fc, en general por medio de la parte proteica que es N terminal a la región Fc. Como se usa en el presente documento, el término "ADCC reducida" se define como una reducción en el número de células diana que se lisan en un tiempo dado, a una concentración de anticuerpo dada en el medio circundante a las células diana, por el mecanismo de ADCC definido anteriormente, y/o bien un incremento en la concentración de anticuerpo en el medio circundante a las células diana, requerido para lograr la lisis de un número dado de células diana en un tiempo dado, por el mecanismo de ADCC. La reducción en la ADCC es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo producido por el mismo tipo de células huésped, usando los mismos procedimientos de producción, purificación, formulación

y almacenamiento estándar (que son conocidos para los expertos en la técnica), pero que no se ha genomanipulado. Por ejemplo, la reducción en ADCC mediada por un anticuerpo que comprende en su dominio Fc una sustitución aminoacídica que reduce la ADCC es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo sin esta sustitución aminoacídica en el dominio Fc. Los ensayos adecuados para medir la ADCC son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 2006/082515 o la publicación PCT n.º WO 2012/130831).

Una "cantidad eficaz" de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para dar como resultado un cambio fisiológico en la célula o tejido al que se administra.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye, retrasa, minimiza o previene efectos adversos de una enfermedad.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, 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). En particular, el individuo o sujeto es un ser humano.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administraría la composición.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural de una enfermedad en el individuo que se trata, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad y remisión o pronóstico mejorado. En algunos modos de realización, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

B) Detalles técnicos de los modos de realización

La invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T con propiedades favorables para su aplicación terapéutica, en particular con una eficacia y seguridad mejoradas (por ejemplo, con respecto a la selectividad hacia las células tumorales sobre las células normales tales como los cardiomiocitos), y una capacidad de producción mejorada (por ejemplo, con respecto a pureza, rendimiento).

Los autores de la invención han descubierto que, de forma sorprendente, la molécula de unión a antígeno activadora de linfocitos T de la invención puede inducir la destrucción de las células tumorales p95HER2+ sin afectar a los cardiomiocitos que se caracterizan por la expresión de bajos niveles de HER2. Se cree que dichos bajos niveles de HER2 en cardiomiocitos son inasequibles para el uso de moléculas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T altamente potentes, ya que las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T dirigidas a HER2, por ejemplo, en base a trastuzumab, pueden destruir cardiomiocitos *in vitro*. De hecho, son conocidos los fármacos actuales dirigidos a HER2 por inducir cardiotoxicidad, probablemente debido a la expresión de HER2 en cardiomiocitos (Valachis *et al.*, *Int. J. Cancer* (2013) 133, 2245-2252). De forma similar, las células MCF10A, una línea celular epitelial humana que se inmortaliza pero no se transforma, que expresa niveles normales de HER2, se pueden destruir por una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T dirigida a HER2, pero no por la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la presente invención. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención también se puede usar para destruir células tumorales que son positivas para p95HER2, pero que han perdido la expresión de HER2 extracelular y, por tanto, son resistentes a los tratamientos dirigidos a HER2 convencionales.

Modificaciones de carga

- Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención pueden comprender sustituciones aminoacídicas en las moléculas Fab comprendidas en las mismas que son en particular eficaces para reducir el emparejamiento incorrecto de las cadenas ligeras con las cadenas pesadas no coincidentes (productos secundarios de tipo Bence-Jones), que se pueden producir en la producción de moléculas de unión a antígeno bi/multiespecíficas basadas en Fab con un intercambio VH/VL en uno (o más, en el caso de moléculas que comprendan más de dos moléculas Fab de unión a antígeno) de sus brazos de unión (véase también la publicación PCT n.º WO 2015/150447, en particular los ejemplos en la misma).
- En consecuencia, en modos de realización particulares, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende
- (a) una primera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2
- (b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí,
- en la que el primer resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada, en particular una región variable de la cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 14, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 15 y la HCDR 3 de SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera, en particular una región variable de la cadena ligera humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 17, la LCDR 2 de SEQ ID NO: 18 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 19; y en la que
- i) en el dominio constante CL de la primera molécula Fab el aminoácido en la posición 124 se sustituye por un aminoácido cargado positivamente (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye por un aminoácido cargado negativamente (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); o
- ii) en el dominio constante CL de la segunda molécula Fab el aminoácido en la posición 124 se sustituye por un aminoácido cargado positivamente (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 de la segunda molécula Fab el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye por un aminoácido cargado negativamente (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T no comprende ambas modificaciones mencionadas en i) y ii). Los dominios constantes CL y CH1 de la segunda molécula Fab no se reemplazan entre sí (es decir, permanecen sin intercambio).
- En un modo de realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un modo de realización preferente independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula 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 de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- En otro modo de realización, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- En un modo de realización particular, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un modo de 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 de acuerdo con Kabat) (en un modo de realización preferente independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- En un modo de realización más particular, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico

(E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

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

En modos de realización particulares, el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) es de isotipo kappa.

De forma alternativa, las sustituciones aminoacídicas de acuerdo con los modos de realización anteriores se pueden realizar en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la segunda molécula Fab en b) en lugar de en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a). En dichos modos de realización particulares, el dominio constante CL de la segunda molécula Fab en b) es de isotipo kappa.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención puede comprender además una tercera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2. En modos de realización particulares, dicha tercera molécula Fab es idéntica a la primera molécula Fab en a). En estos modos de realización, las sustituciones aminoacídicas de acuerdo con los modos de realización anteriores se realizarán en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de cada una de la primera molécula Fab y la tercera molécula Fab. De forma alternativa, las sustituciones aminoacídicas de acuerdo con los modos de realización anteriores se pueden realizar en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la segunda molécula Fab en b), pero no en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab y la tercera molécula Fab.

En modos de realización particulares, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende además un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable.

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

Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se pueden fusionar entre sí en una variedad de configuraciones. Las configuraciones ejemplares se representan en la figura 1.

En modos de realización particulares, los restos de unión a antígeno comprendidos en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T son moléculas Fab. En dichos modos de realización, el primer, segundo, tercer, etc., resto de unión a antígeno se puede denominar en el presente documento como primera, segunda, tercera, etc., molécula Fab, respectivamente. Además, en modos de realización particulares, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable.

En algunos modos de realización, la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc.

En un modo de realización de este tipo, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en las figuras 1G y 1K. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

En otro modo de realización de este tipo, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la primera y la segunda molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en las figuras 1A y 1D. La primera y la segunda molécula Fab se pueden fusionar al dominio Fc directamente o a través de un conector peptídico. En un modo de realización particular, la primera y la segunda molécula Fab se fusionan cada una al dominio Fc a través de una

región bisagra de inmunoglobulina. En un modo de realización específico, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, en particular donde el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁.

5 En otros modos de realización, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o segunda subunidad del dominio Fc.

10 En un modo de realización de este tipo, la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en las figuras 1H y 1L.
15 Opcionalmente, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

20 Las moléculas Fab se pueden fusionar al dominio Fc o entre sí directamente o a través de un conector peptídico, que comprende uno o más aminoácidos, típicamente, aproximadamente 2-20 aminoácidos. Los conectores peptídicos son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. Los conectores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos (G₄S)_n, (SG₄)_n, (G₄S)_n o G₄(SG₄)_n. "n" es en general un número entero de 1 a 10, típicamente de 2 a 4. En un modo de realización, dicho conector peptídico tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos, en un modo de realización una longitud de 5 a 100, en otro modo de realización de 10 a 50 aminoácidos. En un modo de realización, dicho conector peptídico es (GxS)_n o (GxS)_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 un modo de realización x=4 y n=2 o 3, en otro modo de realización x=4 y n=2. En un modo de realización, dicho conector peptídico es (G₄S)₂. Un conector peptídico en particular adecuado para fusionar las cadenas ligeras de Fab de la primera y la segunda molécula Fab entre sí es (G₄S)₂. Un conector peptídico ejemplar adecuado para conectar las cadenas pesadas de Fab del primer y el segundo fragmentos Fab comprende la secuencia (D)-(G₄S)₂ (SEQ ID NO 11 y 12). Otro conector adecuado de este tipo comprende la secuencia (G₄S)₄. Adicionalmente, los conectores pueden comprender (una porción de) una región bisagra de inmunoglobulina. En particular cuando una molécula Fab se fusiona al extremo N de una subunidad del dominio Fc, se puede fusionar por medio de una región bisagra de inmunoglobulina o una porción de la misma, con o sin un conector peptídico adicional.

35 Una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T con un único resto de unión a antígeno (tal como una molécula Fab) que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana (por ejemplo, como se muestra en la figura 1A, D, G, H, K, L) es útil, en particular en casos donde se espera internalización del antígeno de célula diana después de la unión de un resto de unión a antígeno de alta afinidad. En dichos casos, la presencia de más de un resto de unión a antígeno específico para el antígeno de célula diana puede potenciar la internalización del antígeno de célula diana, reduciendo de este modo su disponibilidad.
40

45 En muchos otros casos, sin embargo, será ventajoso tener una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprenda dos o más restos de unión a antígeno (tales como moléculas Fab) específicos para un antígeno de célula diana (véanse los ejemplos mostrados en la figura 1B, 1C, 1E, 1F, 1I, 1J, 1M o 1N), por ejemplo, para optimizar la dirección hacia el sitio diana o para permitir la reticulación de los antígenos de células diana.

50 En consecuencia, en modos de realización particulares, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende además una tercera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2. En un modo de realización, la tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional. En un modo de realización, la tercera molécula Fab es idéntica a la primera molécula Fab (es decir, la primera y la tercera molécula Fab comprenden las mismas secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera y tienen la misma disposición de dominios (es decir, convencional o entrecruzada)). De acuerdo con la invención, la segunda molécula Fab se une específicamente a CD3, y la primera y tercera molécula Fab se unen específicamente a p95HER2.
55

En un modo de realización, la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o segunda subunidad del dominio Fc.

60 En un modo de realización particular, la segunda y la tercera molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena
65

pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y en la que la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en la figura 1B y 1E (modos de realización particulares, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional y preferentemente idéntica a la primera molécula Fab), y la figura 1I y 1M (modos de realización alternativos, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab entrecruzada y preferentemente idéntica a la segunda molécula Fab). La segunda y la tercera molécula Fab se pueden fusionar al dominio Fc directamente o a través de un conector peptídico. En un modo de realización particular, la segunda y la tercera molécula Fab se fusionan cada una al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En un modo de realización específico, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, en particular donde el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

En otro modo de realización, la primera y la tercera molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y en la que la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en la figura 1C y 1F (modos de realización particulares, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional y preferentemente idéntica a la primera molécula Fab), y la figura 1J y 1N (modos de realización alternativos, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab entrecruzada y preferentemente idéntica a la segunda molécula Fab). La primera y la tercera molécula Fab se pueden fusionar al dominio Fc directamente o a través de un conector peptídico. En un modo de realización particular, la primera y la tercera molécula Fab se fusionan cada una al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En un modo de realización específico, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, en particular donde el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

En configuraciones de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T en la que una molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de cada una de las subunidades del dominio Fc a través de regiones bisagra de inmunoglobulina, las dos moléculas Fab, las regiones bisagra y el dominio Fc forman esencialmente una molécula de inmunoglobulina. En un modo de realización particular, la molécula de inmunoglobulina es una inmunoglobulina de clase IgG. En un modo de realización incluso más particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG₁. En otro modo de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG₄. En otro modo de realización particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana. En otros modos de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina humanizada.

En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)) y un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4)). En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En determinados modos de realización, los polipéptidos se unen covalentemente, por ejemplo, por un enlace disulfuro.

En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región constante de la cadena pesada se reemplaza por una región constante de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₂₎-CL₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)), y un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab

comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4)). En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₂₎-CH1₍₂₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En determinados modos de realización, los polipéptidos se unen covalentemente, por ejemplo, por un enlace disulfuro.

En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4)). En otros modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)).

En algunos de estos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido de la cadena ligera de Fab entrecruzada de la segunda molécula Fab, en la que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En otros de estos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎-VL₍₁₎-CL₍₁₎), o un polipéptido en el que el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎), según sea apropiado.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con estos modos de realización puede comprender además (i) un polipéptido de subunidad del dominio Fc (CH2-CH3(-CH4)), o (ii) un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₃₎-CH1₍₃₎-CH2-CH3(-CH4)) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab (VL₍₃₎-CL₍₃₎). En determinados modos de realización, los polipéptidos se unen covalentemente, por ejemplo, por un enlace disulfuro.

En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región constante de la cadena pesada se reemplaza por una región constante de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4)). En otros modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región constante de la cadena pesada se reemplaza por una región constante de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)).

En algunos de estos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido de la cadena ligera de Fab entrecruzada de la segunda molécula Fab, en el que la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₂₎-CH1₍₂₎), y

el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En otros de estos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VL₍₁₎-CL₍₁₎), o un polipéptido en el que el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎), según sea apropiado.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con estos modos de realización puede comprender además (i) un polipéptido de subunidad del dominio Fc (CH2-CH3(-CH4)), o (ii) un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₃₎-CH1₍₃₎-CH2-CH3(-CH4)) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab (VL₍₃₎-CL₍₃₎). En determinados modos de realización, los polipéptidos se unen covalentemente, por ejemplo, por un enlace disulfuro.

En algunos modos de realización, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. En determinados de dichos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T no comprende un dominio Fc. En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en las figuras 1O y 1S.

En otros modos de realización, la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. En determinados de dichos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T no comprende un dominio Fc. En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en las figuras 1P y 1T.

En algunos modos de realización, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además una tercera molécula Fab, en la que dicha tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. En dichos modos de realización particulares, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional. En otros de dichos modos de realización, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab entrecruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en la que los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesada y ligera de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En determinados de dichos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en la figura 1Q y 1U (modos de realización particulares, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional y preferentemente idéntica a la primera molécula Fab).

En algunos modos de realización, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además una tercera molécula Fab, en la que dicha tercera molécula Fab se fusiona en el extremo N de la cadena pesada de Fab al extremo C de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. En dichos modos de realización particulares, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab entrecruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula 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 intercambian/reemplazan entre sí. En otros de dichos modos de realización, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional. En determinados de dichos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo N de la cadena pesada de Fab al extremo C de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en la figura 1W y

1Y (modos de realización particulares, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab entrecruzada y preferentemente idéntica a la segunda molécula Fab).

En algunos modos de realización, la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además una tercera molécula Fab, en la que dicha tercera molécula Fab se fusiona en el extremo N de la cadena pesada de Fab al extremo C de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. En dichos modos de realización particulares, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional. En otros de dichos modos de realización, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab entrecruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula 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 intercambian/reemplazan entre sí. En determinados de dichos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo N de la cadena pesada de Fab al extremo C de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en la figura 1R y 1V (modos de realización particulares, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional y preferentemente idéntica a la primera molécula Fab).

En algunos modos de realización, la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además una tercera molécula Fab, en la que dicha tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. En dichos modos de realización particulares, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab entrecruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula 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 intercambian/reemplazan entre sí. En otros de dichos modos de realización, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional. En determinados de dichos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en la figura 1X y 1Z (modos de realización particulares, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab entrecruzada y preferentemente idéntica a la primera molécula Fab).

En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera) (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎). En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎).

En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎). En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎).

En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab entrecruzada, en la que la región constante de la cadena pesada se reemplaza por una región constante de la

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

De acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores, los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (por ejemplo, moléculas Fab, dominio Fc) se pueden fusionar directamente o a través de diversos conectores, en particular conectores peptídicos que comprenden uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2-20 aminoácidos, que se describen en el presente documento o son conocidos en la técnica. Los conectores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos (G₄S)_n, (SG₄)_n, (G₄S)_n o G₄(SG₄)_n, en los que n es en general un número entero de 1 a 10, típicamente de 2 a 4.

Dominio Fc

El dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste en un par de cadenas polipeptídicas que comprenden dominios de la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es un dímero, del que cada subunidad comprende los dominios constantes de la cadena pesada de IgG CH2 y CH3. Las dos subunidades del dominio Fc se pueden asociar de forma estable entre sí. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende no más de un dominio Fc.

En un modo de realización de acuerdo con la invención, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T es un dominio Fc de IgG. En un modo de realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En otro modo de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄. En un modo de realización más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄ que comprende una sustitución aminoacídica en la posición S228 (numeración del índice EU de Kabat), en particular la sustitución aminoacídica S228P. Esta sustitución aminoacídica reduce el intercambio en el brazo Fab *in vivo* de los anticuerpos IgG₄ (véase Stubenrauch *et al.*, Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). En otro modo de realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc humano. En un modo de realización incluso más particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁ humana. Una secuencia ejemplar de una región Fc de IgG₁ humana se da en SEQ ID NO: 13.

Modificaciones en el dominio Fc que promueven la heterodimerización

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de acuerdo con la invención comprenden diferentes restos de unión a antígeno, que se pueden fusionar a una o a la otra de las dos subunidades del dominio Fc, por tanto las dos subunidades del dominio Fc están típicamente comprendidas en dos cadenas polipeptídicas no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización dan lugar a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T en producción recombinante, será ventajoso, por tanto, introducir en el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

En consecuencia, en modos de realización particulares, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más extensa entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana es en el dominio CH3 del dominio Fc. Por tanto, en un modo de realización, dicha modificación está en el dominio CH3 del dominio Fc.

Existen varios enfoques para las modificaciones en el dominio CH3 del dominio Fc para garantizar la heterodimerización, que se describen bien, por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291. Típicamente, en todos de dichos enfoques, el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se genomanipulan ambos de manera complementaria de modo que cada dominio CH3 (o la cadena pesada que lo comprende) ya no se puede homodimerizar consigo mismo sino que se fuerza a heterodimerizarse con el otro dominio CH3 genomanipulado de forma complementaria (de modo que el primer y segundo dominio CH3 se

heterodimerizan y no se forman homodímeros entre los dos primeros o los dos segundos dominios CH3). Estos diferentes enfoques para una heterodimerización de la cadena pesada mejorada se contemplan como diferentes alternativas en combinación con las modificaciones de la cadena pesada-ligera (intercambio/reemplazo de VH y VL en un brazo de unión y la introducción de sustituciones de aminoácidos cargados con cargas opuestas en la interfase CH1/CL) en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención lo que reduce el emparejamiento incorrecto de la cadena ligera y los productos secundarios de tipo Bence Jones.

En un modo de realización específico, dicha modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc es una modificación denominada "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 botón en ojal se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway *et al.*, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 715 (2001). En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfase de un primer polipéptido y una correspondiente cavidad ("ojal") en la interfase de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se puede situar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

En consecuencia, en un modo de realización particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se reemplaza un residuo aminoacídico por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando de este modo una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que se puede situar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un residuo aminoacídico por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la que se puede situar la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad.

Preferentemente, dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande se selecciona del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

Preferentemente, dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

La protuberancia y la cavidad se pueden realizar alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, por mutagénesis específica de sitio o por síntesis peptídica.

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

Aún en otro modo de realización, en la primera subunidad del dominio Fc, adicionalmente se reemplaza el residuo de serina en la posición 354 por un residuo de cisteína (S354C) o se reemplaza el residuo de ácido glutámico en la posición 356 por un residuo de cisteína (E356C) (en particular el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza por un residuo de cisteína), y en la segunda subunidad del dominio Fc, adicionalmente se reemplaza el residuo de tirosina en la posición 349 por un residuo de cisteína (Y349C) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). La introducción de estos dos residuos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc, estabilizando además el dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 715 (2001)).

En un modo de realización particular, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas S354C y T366W, y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización particular, la molécula Fab que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T se fusiona (opcionalmente por medio de una molécula Fab que se une específicamente a un antígeno de célula diana) a la primera subunidad del dominio Fc (que comprende la modificación "botón"). Sin quedar vinculado a ninguna teoría, la fusión de la molécula Fab que une específicamente un antígeno activador de

linfocitos T a la subunidad que contiene un botón del dominio Fc minimizará (además) la generación de moléculas de unión a antígeno que comprenden dos moléculas Fab que se unen a un antígeno activador de linfocitos T (impedimento estérico de dos polipéptidos que contienen botón).

5 Otras técnicas de modificación de CH3 para garantizar la heterodimerización se contemplan como alternativas y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291.

10 En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento EP 1870459 A1, se usa de forma alternativa. Este enfoque se basa en la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones aminoacídicas específicas en la interfase CH3/dominio CH3 entre las dos subunidades del dominio Fc. Un modo de realización preferente son las mutaciones aminoacídicas R409D; K370E en uno de los dos dominios CH3 (del dominio Fc) y las mutaciones aminoacídicas D399K; E357K en el otro de los dominios CH3 del dominio Fc (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

15 En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende la mutación aminoacídica T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones aminoacídicas T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, y adicionalmente las mutaciones aminoacídicas R409D; K370E en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones aminoacídicas D399K; E357K en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

20 En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende las mutaciones aminoacídicas S354C, T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones aminoacídicas Y349C, T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, o dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende las mutaciones aminoacídicas Y349C, T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones aminoacídicas S354C, T366S, L368A, Y407V en los dominios CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc y adicionalmente las mutaciones aminoacídicas R409D; K370E en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones aminoacídicas D399K; E357K en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (todas las numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

25 En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2013/157953 se usa de forma alternativa. En un modo de realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica T366K y un segundo dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica L351D (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización, el primer dominio CH3 comprende otra mutación aminoacídica L351K. En otro modo de realización, el segundo dominio CH3 comprende otra mutación aminoacídica seleccionada de Y349E, Y349D y L368E (preferentemente L368E) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

30 En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2012/058768 se usa de forma alternativa. En un modo de realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas L351Y, Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas T366A, K409F. En otro modo de realización, el segundo dominio CH3 comprende otra mutación aminoacídica en la posición T411, D399, S400, F405, N390 o K392, por ejemplo, seleccionada de 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 de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas L351Y, Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas T366V, K409F. En otro modo de realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas T366A, K409F. En otro modo de realización, el segundo dominio CH3 comprende además las mutaciones aminoacídicas R392E, T411E, D399R y S400R (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

35 En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2011/143545 se usa de forma alternativa, por ejemplo, con la modificación aminoacídica en una posición seleccionada del grupo que consiste en 368 y 409 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

40 En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2011/090762, que también usa la tecnología de botones en ojales descrita anteriormente, se usa de forma alternativa. En un modo de realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica T366W y un segundo dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica Y407A. En un modo de realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica T366Y y un segundo dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica Y407T (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

45 En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o su dominio Fc

es de la subclase IgG₂ y el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2010/129304 se usa de forma alternativa.

En un modo de realización alternativo, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media en los efectos de conducción electrostática, por ejemplo, como se describe en la publicación PCT n.º WO 2009/089004. En general, este procedimiento implica el reemplazo de uno o más residuos aminoacídicos en la interfase de las dos subunidades del dominio Fc por residuos aminoacídicos cargados de modo que la formación de homodímeros se vuelve electrostáticamente desfavorable pero la heterodimerización electrostáticamente favorable. En un modo de realización de este tipo, un primer dominio CH3 comprende la sustitución aminoacídica de K392 o N392 con un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D), preferentemente K392D o N392D) y un segundo dominio CH3 comprende la sustitución aminoacídica de D399, E356, D356 o E357 con un aminoácido cargado positivamente (por ejemplo, lisina (K) o arginina (R), preferentemente D399K, E356K, D356K o E357K, y más preferentemente D399K y E356K). En otro modo de realización, el primer dominio CH3 comprende además la sustitución aminoacídica de K409 o K409 con un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D), preferentemente K409D o K409D). En otro modo de realización, el primer dominio CH3 comprende además o de forma alternativa la sustitución aminoacídica de K439 y/o K370 con un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D)) (todas las numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Aún en otro modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2007/147901 se usa de forma alternativa. En un modo de realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas K253E, D282K y K322D y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas D239K, E240K y K292D (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Todavía en otro modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2007/110205 se puede usar de forma alternativa.

En un modo de realización, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas K392D y K409D, y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas D356K y D399K (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Modificaciones en el dominio Fc que reducen la unión al receptor Fc y/o la función efectora

El dominio Fc confiere a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T propiedades farmacocinéticas favorables, incluyendo una semivida en suero larga que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una proporción de distribución tejido-sangre favorable. Al mismo tiempo, sin embargo, puede dar lugar a la dirección indeseable de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T hacia células que expresan receptores Fc en lugar de a las células portadoras de antígenos preferentes. Además, la coactivación de las vías de señalización del receptor Fc puede dar lugar a la liberación de citocinas lo que, en combinación con las propiedades activadoras de linfocitos T y la semivida larga de la molécula de unión a antígeno, da como resultado una activación excesiva de receptores de citocinas y efectos secundarios graves tras la administración sistémica. La activación de células inmunitarias (portadoras del receptor Fc) distintas de linfocitos T incluso puede reducir la eficacia de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T debido a la destrucción potencial de linfocitos T, por ejemplo, por linfocitos NK.

En consecuencia, en modos de realización particulares, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención presenta una afinidad de unión reducida por un receptor Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural. En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) presenta menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la afinidad de unión por un receptor Fc, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural), y/o menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la función efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural). En un modo de realización, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) no se une sustancialmente a un receptor Fc y/o induce función efectora. En un modo de realización particular, el receptor Fc es un receptor Fc γ . En un modo de realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En un modo de realización, el receptor Fc es un receptor Fc activador. En un modo de realización específico, el receptor Fc es un receptor Fc γ humano activador, más específicamente Fc γ R1IIa, Fc γ RI o Fc γ R1IIa humano, lo más específicamente Fc γ R1IIa humano. En un modo de realización, la función efectora es una o más seleccionada del grupo de CDC, ADCC, ADCP y secreción de citocinas. En un modo de realización particular, la función efectora es ADCC. En un modo de realización, el dominio Fc presenta una afinidad de unión sustancialmente similar al receptor Fc neonatal (FcRn) en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural. Se logra una unión

5 sustancialmente similar a FcRn cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) presenta más de aproximadamente un 70 %, en particular más de aproximadamente un 80 %, más en particular más de aproximadamente un 90 % de la afinidad de unión de un dominio Fc de IgG₁ natural (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural) por FcRn.

10 En determinados modos de realización, el dominio Fc se genomanipula para tener afinidad de unión reducida por un receptor Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. En modos de realización particulares, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una o más mutaciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor Fc y/o función efectora. Típicamente, la misma una o más mutaciones aminoacídicas están presentes en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En un modo de realización, la mutación aminoacídica reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor Fc. En un modo de realización, la mutación aminoacídica reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor Fc en al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces. En modos de realización donde existe más de una mutación aminoacídica que reduce la afinidad de unión del dominio Fc por el receptor Fc, la combinación de estas mutaciones aminoacídicas puede reducir la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor Fc en al menos 10 veces, al menos 20 veces o incluso al menos 50 veces. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc genomanipulado presenta menos de un 20 %, en particular menos de un 10 %, más en particular menos de un 5 % de la afinidad de unión por un receptor Fc en comparación con una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc no genomanipulado. En un modo de realización particular, el receptor Fc es un receptor Fc γ . En algunos modos de realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En algunos modos de realización, el receptor Fc es un receptor Fc activador. En un modo de realización específico, el receptor Fc es un receptor Fc γ humano activador, más específicamente Fc γ R11a, Fc γ RI o Fc γ R11a humano, lo más específicamente Fc γ R11a humano. Preferentemente, se reduce la unión a cada uno de estos receptores. En algunos modos de realización también se reduce la afinidad de unión por un componente del complemento, específicamente la afinidad de unión por C1q. En un modo de realización, no se reduce la afinidad de unión por el receptor Fc neonatal (FcRn). La unión sustancialmente similar a FcRn, es decir, la conservación de la afinidad de unión del dominio Fc por dicho receptor, se logra cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) presenta más de aproximadamente un 70 % de la afinidad de unión de una forma no genomanipulada del dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicha forma no genomanipulada del dominio Fc) por FcRn. El dominio Fc, o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención que comprenden dicho dominio Fc, pueden presentar más de aproximadamente un 80 % e incluso más de aproximadamente un 90 % de dicha afinidad. En determinados modos de realización, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se genomanipula para tener función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. La función efectora reducida puede incluir, pero no se limita a, una o más de las siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, captación de antígenos mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígenos reducida, unión a linfocitos NK reducida, unión a macrófagos reducida, unión a monocitos reducida, unión a células polimorfonucleares reducida, señalización directa que induce apoptosis reducida, reticulación de anticuerpos unidos a diana reducida, maduración de células dendríticas reducida o activación de linfocitos T reducida. En un modo de realización, la función efectora reducida es una o más seleccionadas del grupo de CDC reducida, ADCC reducida, ADCP reducida y secreción de citocinas reducida. En un modo de realización particular, la función efectora reducida es ADCC reducida. En un modo de realización, la ADCC reducida es menor de un 20 % de la ADCC inducida por un dominio Fc no genomanipulado (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc no genomanipulado).

50 En un modo de realización, la mutación aminoacídica que reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor Fc y/o función efectora es una sustitución aminoacídica. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en una posición seleccionada del grupo de E233, L234, L235, N297, P331 y P329 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización más específico, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en una posición seleccionada del grupo de L234, L235 y P329 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En algunos modos de realización, el dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas L234A y L235A (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular un dominio Fc de IgG₁ humana. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329. En un modo de realización más específico, la sustitución aminoacídica es P329A o P329G, en particular P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329 y otra sustitución aminoacídica en una posición seleccionada de E233, L234, L235, N297 y P331 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización más específico, la otra sustitución aminoacídica es E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En modos de realización particulares, el dominio Fc comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones P329, L234 y L235 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En modos de realización más particulares, el dominio Fc comprende las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G ("P329G LALA", "PGLALA" o

"LALAPG"). Específicamente, en modos de realización particulares, cada subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración del índice EU de Kabat), es decir, en cada una de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc, se reemplaza el residuo de leucina en la posición 234 por un residuo de alanina (L234A), se reemplaza el residuo de leucina en la posición 235 por un residuo de alanina (L235A) y se reemplaza el residuo de prolina en la posición 329 por un residuo de glicina (P329G) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular un dominio Fc de IgG₁ humana. La combinación "P329G LALA" de sustituciones aminoacídicas anula casi por completo la unión al receptor Fcγ (así como al complemento) de un dominio Fc de IgG₁ humana, como se describe en la publicación PCT n.º WO 2012/130831. El documento WO 2012/130831 también describe procedimientos de preparación de dichos dominios Fc mutantes y procedimientos para determinar sus propiedades tales como unión al receptor Fc o funciones efectoras.

Los anticuerpos IgG₄ presentan una afinidad de unión reducida por receptores Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con anticuerpos IgG₁. Por ende, en algunos modos de realización, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención es un dominio Fc de IgG₄, en particular un dominio Fc de IgG₄ humana. En un modo de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones aminoacídicas en la posición S228, específicamente la sustitución aminoacídica S228P (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). Para reducir además su afinidad de unión por un receptor Fc y/o su función efectora, en un modo de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución aminoacídica en la posición L235, específicamente la sustitución aminoacídica L235E (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329, específicamente la sustitución aminoacídica P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización particular, el dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones S228, L235 y P329, específicamente las sustituciones aminoacídicas S228P, L235E y P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). Dichos mutantes de dominio Fc de IgG₄ y sus propiedades de unión al receptor Fcγ se describen en la publicación PCT n.º WO 2012/130831.

En un modo de realización particular, el dominio Fc que presenta afinidad de unión reducida por un receptor Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural, es un dominio Fc de IgG₁ humana que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y opcionalmente P329G, o un dominio Fc de IgG₄ humana que comprende las sustituciones aminoacídicas S228P, L235E y opcionalmente P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En determinados modos de realización se ha eliminado la N-glucosilación del dominio Fc. En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc comprende una mutación aminoacídica en la posición N297, en particular una sustitución aminoacídica que reemplaza asparagina por alanina (N297A) o ácido aspártico (N297D) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Además de los dominios Fc descritos anteriormente en el presente documento y en la publicación PCT n.º WO 2012/130831, los dominios Fc con unión al receptor Fc y/o función efectora reducidas también incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de dominio Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6.737.056) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). Dichos mutantes Fc incluyen mutantes Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el denominado mutante Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 a alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

Se pueden preparar dominios Fc mutantes por delección, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis específica de sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios nucleotídicos correctos se pueden verificar, por ejemplo, por secuenciación.

La unión a receptores Fc se puede determinar fácilmente, por ejemplo, por ELISA, o por resonancia de plasmón superficial (RPS) usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores Fc tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. De forma alternativa, se puede evaluar la afinidad de unión de dominios Fc o moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células que comprenden un dominio Fc por los receptores Fc usando líneas celulares conocidas por expresar receptores Fc particulares, tales como linfocitos NK humanos que expresan el receptor FcγIIIa.

La función efectora de un dominio Fc, o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc, se puede medir por procedimientos conocidos en la técnica. Los ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 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); la patente de EE. UU. n.º 5.821.337; Bruggemann *et al.*, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras

útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

En algunos modos de realización, se reduce la unión del dominio Fc a un componente del complemento, específicamente a C1q. En consecuencia, en algunos modos de realización en los que el dominio Fc se genomanipula para tener una función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye una CDC reducida. Se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si el dominio Fc, o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende el dominio Fc, se puede unir a C1q y, por ende, tiene actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg *et al.*, Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Restos de unión a antígeno

La molécula de unión a antígeno de la invención es biespecífica, es decir, comprende al menos dos restos de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a dos determinantes antigénicos distintos. De acuerdo con modos de realización particulares de la invención, los restos de unión a antígeno son moléculas Fab (es decir, dominios de unión a antígeno compuestos por una cadena pesada y una ligera, comprendiendo cada una un dominio variable y uno constante). En un modo de realización, dichas moléculas Fab son humanas. En otro modo de realización, dichas moléculas Fab son humanizadas. Aún en otro modo de realización, dichas moléculas Fab comprenden dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanos.

Preferentemente, al menos uno de los restos de unión a antígeno es una molécula Fab entrecruzada. Dicha modificación reduce el emparejamiento incorrecto de las cadenas pesadas y ligeras a partir de diferentes moléculas Fab, mejorando de este modo el rendimiento y la pureza de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención en la producción recombinante. En una molécula Fab entrecruzada particular útil para la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención, los dominios variables de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab (VL y VH, respectivamente) se intercambian. Sin embargo, incluso con este intercambio de dominios, la preparación de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede comprender determinados productos secundarios debido a la denominada interacción de tipo Bence Jones entre las cadenas pesadas y ligeras con emparejamiento incorrecto (véase Schaefer *et al.*, PNAS, 108 (2011) 11187-11191). Para reducir además el emparejamiento incorrecto de las cadenas pesada y ligera de diferentes moléculas Fab y por tanto incrementar la pureza y el rendimiento de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T deseada, de acuerdo con la presente invención, se pueden introducir aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones aminoacídicas específicas en los dominios CH1 y CL de la(s) molécula(s) Fab que se une(n) específicamente a un antígeno de célula diana, o bien la molécula Fab que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T. Las modificaciones de carga se realizan en la(s) molécula(s) Fab convencional(es) comprendida(s) en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (tal como se muestra, por ejemplo, en las figuras 1 A-C, G-J), o bien en la(s) molécula(s) Fab entrecruzada(s) comprendida(s) en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (tal como se muestra, por ejemplo, en la figura 1 D-F, K-N) (pero no en ambas). En modos de realización particulares, las modificaciones de carga se realizan en la(s) molécula(s) Fab convencional(es) comprendida(s) en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (que en modos de realización particulares se une(n) específicamente al antígeno de célula diana).

En un modo de realización particular de acuerdo con la invención, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede unir simultáneamente a un antígeno de célula diana, a saber, p95HER2, y un antígeno activador de linfocitos T, a saber, CD3. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede reticular un linfocito T y una célula diana uniéndose simultáneamente a un antígeno de célula diana y un antígeno activador de linfocitos T. En un modo de realización incluso más particular, dicha unión simultánea da como resultado la lisis de la célula diana, en particular una célula tumoral. En un modo de realización, dicha unión simultánea da como resultado la activación del linfocito T. En otros modos de realización, dicha unión simultánea da como resultado una respuesta celular de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, seleccionada del grupo de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. En un modo de realización, la unión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T al antígeno activador de linfocitos T CD3, sin unión simultánea al antígeno de célula diana p95HER2 no da como resultado activación de linfocitos T.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede redireccionar la actividad citotóxica de un linfocito T hacia una célula diana. En un modo de realización particular, dicho redireccionamiento es independiente de la presentación de antígenos peptídicos mediada por MHC por la célula diana y/o la especificidad del linfocito T.

En particular, un linfocito T de acuerdo con cualquiera de los modos de realización de la invención es un linfocito T citotóxico. En algunos modos de realización, el linfocito T es un linfocito T CD4⁺ o uno CD8⁺, en particular un linfocito T CD8⁺.

5

Resto de unión a antígeno activador de linfocitos T

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende al menos un resto de unión a antígeno, en particular una molécula Fab, que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T, a saber, CD3 (también denominado en el presente documento "resto de unión a antígeno activador de linfocitos T o molécula Fab de unión a antígeno activador de linfocitos T"). En un modo de realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende no más de un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un antígeno activador de linfocitos T. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T proporciona unión monovalente al antígeno activador de linfocitos T.

10

15

En modos de realización particulares, el resto de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T es una molécula Fab entrecruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula 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 intercambian/reemplazan entre sí. En dichos modos de realización, el/los resto(s) de unión a antígeno que se une(n) específicamente a un antígeno de célula diana es/son preferentemente una molécula Fab convencional. En modos de realización donde existe más de un resto de unión a antígeno, en particular molécula Fab, que se une específicamente a un antígeno de célula diana comprendido en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, el resto de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T es preferentemente una molécula Fab entrecruzada y los restos de unión a antígeno que se unen específicamente a un antígeno de célula diana son moléculas Fab convencionales.

20

25

En modos de realización alternativos, el resto de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T es una molécula Fab convencional. En dichos modos de realización, el/los resto(s) de unión a antígeno que se une(n) específicamente a un antígeno de célula diana es/son una molécula Fab entrecruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula 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 intercambian/reemplazan entre sí.

30

De acuerdo con la invención, el antígeno activador de linfocitos T es CD3, en particular CD3 humano (SEQ ID NO: 1) o CD3 de macaco cangrejero (SEQ ID NO: 2), lo más en particular CD3 humano. En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T tiene reactividad cruzada por (es decir, se une específicamente a) CD3 humano y de macaco cangrejero. En algunos modos de realización, el antígeno activador de linfocitos T es la subunidad épsilon de CD3 (CD3 épsilon).

35

40

En algunos modos de realización, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T se une específicamente a CD3, en particular a CD3 épsilon, y comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10.

45

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno de unión a CD3, en particular la molécula Fab, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, y una región variable de la cadena ligera que comprende la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 8, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10.

50

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno de unión a CD3, en particular la molécula Fab, comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 3 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 7.

55

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno de unión a CD3, en particular la molécula Fab, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

60

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno de unión a CD3, en particular la molécula Fab, comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 3 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 7.

65

Resto de unión a antígeno de célula diana

- La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende al menos un resto de unión a antígeno, en particular una molécula Fab, que se une específicamente a p95HER2 (antígeno de célula diana). En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende dos restos de unión a antígeno, en particular moléculas Fab, que se unen específicamente a p95HER2. En un modo de realización particular de este tipo, cada uno de estos restos de unión a antígeno se une específicamente al mismo determinante antigénico. En un modo de realización incluso más particular, todos estos restos de unión a antígeno son idénticos, es decir, comprenden las mismas secuencias de aminoácidos incluyendo las mismas sustituciones aminoacídicas en el dominio CH1 y CL como se describe en el presente documento (si las hay). En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a p95HER2. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende no más de dos restos de unión a antígeno, en particular moléculas Fab, que se unen específicamente a p95HER2.
- En modos de realización particulares, el/los resto(s) de unión a antígeno que se une(n) específicamente a p95HER2 es/son una molécula Fab convencional. En dichos modos de realización, el/los resto(s) de unión a antígeno que se une(n) específicamente a un antígeno activador de linfocitos T es/son una molécula Fab entrecruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula 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 intercambian/reemplazan entre sí.
- En modos de realización alternativos, el/los resto(s) de unión a antígeno que se une(n) específicamente a p95HER2 es/son una molécula Fab entrecruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula 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 intercambian/reemplazan entre sí. En dichos modos de realización, el/los resto(s) de unión a antígeno que se une(n) específicamente a un antígeno activador de linfocitos T es/son una molécula Fab convencional.
- El resto de unión a p95HER2 puede dirigir la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral que expresa p95HER2.
- En un modo de realización, el resto de unión a antígeno, en particular la molécula Fab, que se une específicamente a p95HER2 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR) 1 de SEQ ID NO: 14, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 15 y la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera que comprende la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 17, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 18 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 19. En otro modo de realización, el resto de unión a antígeno, en particular la molécula Fab, que se une específicamente a p95HER2 comprende una región variable de la cadena pesada que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 20 y una región variable de la cadena ligera que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 21. Todavía en otro modo de realización, el resto de unión a antígeno, en particular la molécula Fab, que se une específicamente a p95HER2 comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 20 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 21. En otro modo de realización, el resto de unión a antígeno p95HER2 comprende una versión humanizada de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 20 y una versión humanizada de la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 21. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno p95HER2 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 14, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 15, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 17, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 18, la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 19, y secuencias estructurales de la región variable de la cadena pesada y ligera humanas.
- En un modo de realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 22, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 23, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 24 y un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 25.
- En otro modo de realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 22, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 23, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 24 y una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 25. En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 26, un polipéptido que está en al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 27, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 28 y un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 29. En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 26, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 27, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 28 y una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 29.

Polinucleótidos

La invención proporciona además polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento.

Los polinucleótidos que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se pueden expresar como un único polinucleótido que codifica toda la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o como múltiples (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos que se coexpresan. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se coexpresan se pueden asociar a través de, por ejemplo, enlaces disulfuro u otros medios para formar una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T funcional. Por ejemplo, la porción de cadena ligera de una molécula Fab se puede codificar por un polinucleótido separado de la porción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende la porción de cadena pesada de la molécula Fab, una subunidad del dominio Fc y opcionalmente (parte de) otra molécula Fab. Cuando se coexpresan, los polipéptidos de la cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de la cadena ligera para formar la molécula Fab. En otro ejemplo, la porción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende una de las dos subunidades del dominio Fc y opcionalmente (parte de) una o más moléculas Fab se podría codificar por un polinucleótido separado de la porción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende la otra de las dos subunidades del dominio Fc y opcionalmente (parte de) una molécula Fab. Cuando se coexpresen, las subunidades del dominio Fc se asociarán para formar el dominio Fc.

En algunos modos de realización, el polinucleótido aislado codifica toda la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento. En otros modos de realización, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido comprendido en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento.

En determinados modos de realización, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otros modos de realización, un polinucleótido es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN puede ser monocatenario o bicatenario.

Procedimientos recombinantes

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se pueden obtener, por ejemplo, por síntesis peptídica en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, uno o más polinucleótidos que codifican la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (fragmento), por ejemplo, como se describe anteriormente, se aíslan e insertan en uno o más vectores para clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho polinucleótido se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales. En un modo de realización, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención. Se pueden usar procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (fragmento) junto con señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Véanse, 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 and Wiley Interscience, N.Y. (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que el polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (fragmento) (es decir, la región codificante) se clona en asociación funcional con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o la traducción. Como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, se puede considerar que es parte de una región codificante, si está presente, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores transcripcionales, intrones, regiones no traducidas 5' y 3' y similares, no es parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes pueden estar presentes en una única construcción polinucleotídica, por ejemplo, en un único vector, o en construcciones polinucleotídicas separadas, 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 de la presente invención puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan pos o cotraduccionalmente en las proteínas finales por medio de escisión proteolítica. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterógenas, fusionadas o bien no fusionadas a un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (fragmento) de la invención, o variante o derivado de la misma. Las regiones codificantes heterógenas incluyen sin limitación elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterógeno. Una asociación funcional es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más

secuencias reguladoras de tal forma que dispone la expresión del producto génico bajo la influencia o control de la(s) secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con la misma) se "asocian de forma funcional" si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión de dirigir la expresión del producto génico ni interfiere con la capacidad del molde de ADN para transcribirse. Por tanto, una región promotora se asociará de forma funcional con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor puede efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo potenciadores, operadores, represores y señales de finalización de la transcripción, se pueden asociar de forma funcional con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula. Los promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción se divulgan en el presente documento. Una variedad de regiones de control de la transcripción son conocidas por los expertos en la técnica. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción, que funcionan en células de vertebrado, tales como, pero sin limitarse a, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano inmediato, conjuntamente con intrón-A), virus de simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tales como, por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovina y α -globina de conejo, así como otras secuencias que pueden controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles (por ejemplo, promotores inducibles por tetraciclinas). De forma similar, una variedad de elementos de control de la traducción son conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a sitios de unión a ribosomas, codones de iniciación y finalización de la traducción y elementos derivados de sistemas víricos (en particular un sitio de entrada del ribosoma interno o IRES, también denominado secuencia CITE). El casete de expresión también puede incluir otros rasgos característicos tales como un origen de replicación y/o elementos de integración cromosómica tales como repeticiones terminales largas (RTL) retrovíricas o repeticiones terminales invertidas (RTI) víricas adenoasociadas (VAA).

Se pueden asociar regiones codificantes de polinucleótido y ácidos nucleico de la presente invención con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, si se desea la secreción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, se puede disponer el ADN que codifica una secuencia señal hacia 5' del ácido nucleico que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención o un fragmento de la misma. De acuerdo con la hipótesis de señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína en crecimiento a través del retículo endoplásmico rugoso. Los expertos en la técnica saben que los polipéptidos secretados por células de vertebrado en general tienen un péptido señal fusionado al extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinados modos de realización se usa el péptido señal natural, por ejemplo, un péptido señal de la cadena pesada o la cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que conserva la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que está funcionalmente asociado con él. De forma alternativa, se puede usar un péptido señal de mamífero heterólogo, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder natural se puede sustituir con la secuencia líder del activador del plasminógeno tisular (APT) humano o β -glucuronidasa de ratón.

El ADN que codifica una secuencia proteica corta que se podría usar para facilitar la posterior purificación (por ejemplo, una marca histidina) o ayudar a marcar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede incluir dentro de o en los extremos del polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (fragmento).

En otro modo de realización, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. En determinados modos de realización, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de la invención. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, descritos en el presente documento con relación a polinucleótidos y vectores, respectivamente. En un modo de realización de este tipo, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) uno o más vectores que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican (parte de) una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de sistema celular que se puede genomanipular para generar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención o fragmentos de las mismas. Las células huésped adecuadas para replicación y para sustentar la expresión de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T son bien conocidas en la técnica. Dichas células se pueden transfectar o traducir según sea apropiado con el vector de expresión particular y se pueden cultivar grandes cantidades de células que contienen vectores para sembrar fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para aplicaciones clínicas. Las células huésped adecuadas incluyen microorganismos procariontes, tales como *E.*

coli, o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto o similares. Por ejemplo, se pueden producir polipéptidos en bacterias, en particular cuando no es necesaria la glucosilación. Después de la expresión, se puede aislar el polipéptido a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente. Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras con vías de glucosilación que se han "humanizado", dando como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004) y Li *et al.*, Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar conjuntamente con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas). También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adaptan para cultivar en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293T como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, J Gen Virol 36, 59 (1977)), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI (como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO-dhfr (Urlaub *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003). Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo unas pocas, pero también células comprendidas en un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado. En un modo de realización, la célula huésped es una célula eucariota, preferentemente 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, célula Y0, NS0, Sp20). Las tecnologías estándar son conocidas en la técnica por expresar genes exógenos en estos sistemas. Las células que expresan un polipéptido que comprende la cadena pesada o bien la ligera de un dominio de unión a antígeno tal como un anticuerpo se pueden genomanipular para expresar también la otra de las cadenas de anticuerpo de modo que el producto expresado es un anticuerpo que tiene tanto una cadena pesada como una ligera.

En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de producción de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, como se proporciona en el presente documento, en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y, opcionalmente, recuperar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la célula huésped (o medio de cultivo de célula huésped).

Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se pueden fusionar genéticamente entre sí. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede diseñar de modo que sus componentes se fusionen directamente entre sí o indirectamente a través de una secuencia conectora. La composición y longitud del conector se pueden determinar de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica y se pueden someter a prueba para determinar su eficacia. Los ejemplos de secuencias conectoras entre diferentes componentes de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T se encuentran en las secuencias proporcionadas en el presente documento. También se pueden incluir secuencias adicionales para incorporar un sitio de escisión para separar los componentes individuales de la fusión si se desea, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de endopeptidasas.

En determinados modos de realización, el uno o más restos de unión a antígeno de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T comprenden al menos una región variable de anticuerpo que se puede unir a un determinante antigénico. Las regiones variables pueden formar parte de y derivarse de anticuerpos naturales o no naturales y fragmentos de los mismos. Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos no naturales se pueden construir usando síntesis peptídica en fase sólida, se pueden producir de forma recombinante (por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.186.567) o se pueden obtener, por ejemplo, cribando colecciones combinatorias que comprenden cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase, por ejemplo la

patente de EE. UU. n.º 5.969.108 concedida a McCafferty).

Se puede usar cualquier especie animal de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o región variable en las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, dominios de unión a antígeno o regiones variables no limitantes útiles en la presente invención pueden ser de origen murino, de primate o humano. Si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T está destinada para uso humano, se puede usar una forma quimérica de anticuerpo en la que las regiones constantes del anticuerpo son de un ser humano. También se puede preparar una forma humanizada o completamente humana del anticuerpo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.565.332 concedida a Winter). La humanización se puede lograr por diversos procedimientos incluyendo, pero sin limitarse a (a) injertar las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en regiones estructurales y constantes humanas (por ejemplo, anticuerpo receptor) con o sin conservación de los residuos estructurales cruciales (por ejemplo, los que son importantes para conservar buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpo), (b) injertar solo las regiones determinantes de especificidad no humanas (SDR o a-CDR; los residuos cruciales para la interacción anticuerpo-antígeno) en regiones estructurales y constantes humanas, o (c) trasplantar todos los dominios variables no humanos, pero "enmascararlos" con una sección de tipo humana por reemplazo de residuos de superficie. Los anticuerpos humanizados y procedimientos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332, 323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); patentes de EE. UU. n.ºs 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 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 Immunol* 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri *et al.*, *Methods* 36, 25-34 (2005) (que describen un injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36, 43-60 (2005) (que describen el "reordenamiento de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36, 61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (que describen el enfoque de "selección guiada" al reordenamiento de FR). Se pueden producir anticuerpos humanos y regiones variables humanas usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Las regiones variables humanas pueden formar parte de y derivarse de anticuerpos monoclonales humanos preparados por el procedimiento de hibridoma (véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). También se pueden preparar anticuerpos humanos y regiones variables humanas administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se haya modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigénica (véase, por ejemplo, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005)). También se pueden generar anticuerpos humanos y regiones variables humanas aislando secuencias de regiones variables de clones de Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de humano (véase, por ejemplo, Hoogenboom *et al.*, en *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)). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab.

En determinados modos de realización, los restos de unión a antígeno útiles en la presente invención se genomanipulan para tener una afinidad de unión potenciada de acuerdo con, por ejemplo, los procedimientos divulgados en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0132066. La capacidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención para unirse a un determinante antigénico específico se puede medir a través de un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas familiares para un experto en la técnica, por ejemplo, técnica de resonancia de plasmón superficial (analizada en un sistema BIACORE T100) (Liljeblad, *et al.*, *Glyco J* 17, 323-329 (2000)), y ensayos de unión tradicionales (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)). Se pueden usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o dominio variable que compite con un anticuerpo de referencia por la unión a un antígeno particular, por ejemplo, un anticuerpo que compite con el anticuerpo V9 por la unión a CD3. En determinados modos de realización, un anticuerpo competidor de este tipo se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o uno conformacional) que está unido por el anticuerpo de referencia. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology*, vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). En un ensayo de competencia ejemplar se incubaba el 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 el documento US 6.054.297) y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a prueba para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión a antígeno. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incubaba el antígeno inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al antígeno, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba en relación con la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión a antígeno. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, cap.14 (Cold Spring Harbor

Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

5 Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T preparadas como se describe en el presente documento se pueden purificar por técnicas conocidas en la técnica tales como cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores tales como carga neta, hidrofobia, hidrofilia, etc., y serán evidentes para los expertos en la técnica. Para la purificación por cromatografía de afinidad se puede usar un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T.

10 Por ejemplo, para la purificación por cromatografía de afinidad de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención, se puede usar una matriz con proteína A o proteína G. Se pueden usar la cromatografía de afinidad con proteína A o G y la cromatografía de exclusión por tamaño secuenciales para aislar una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T esencialmente como se describe en los ejemplos. Se puede determinar la pureza de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T por cualquiera de una variedad de procedimientos analíticos bien conocidos, incluyendo electroforesis

15 en gel, cromatografía de líquidos de alta presión y similares. Por ejemplo, se mostró que las proteínas de fusión de la cadena pesada expresadas como se describe en los ejemplos estaban intactas y apropiadamente ensambladas como se demostró por SDS-PAGE reductora (véase por ejemplo, la figura 4). Se resolvieron tres bandas aproximadamente a Mr 25.000, Mr 50.000 y Mr 75.000, correspondientes a los pesos moleculares predichos de la proteína de fusión de la cadena ligera, cadena pesada y cadena pesada/cadena ligera de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T.

Ensayos

25 Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento se pueden identificar, cribar o caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

Ensayos de afinidad

30 La afinidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T por un receptor Fc o un antígeno diana se puede determinar, por ejemplo, por resonancia de plasmón superficial (RPS), usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores o proteínas diana tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. De forma alternativa, la unión de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T para diferentes receptores o antígenos diana se puede evaluar usando líneas celulares que expresan el receptor o antígeno diana particular, por ejemplo por citometría de flujo (FACS). En lo que sigue se describe un modo de realización ilustrativo y ejemplar específico para medir la afinidad de unión.

40 De acuerdo con un modo de realización, K_D se mide por resonancia de plasmón superficial usando una máquina BIAcore® T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

45 Para analizar la interacción entre la porción de Fc y los receptores Fc, se captura el receptor Fc recombinante con marca His por un anticuerpo anti-Penta His (Qiagen) inmovilizado en chips CM5 y se usan las construcciones biespecíficas como analitos. En resumen, se activan chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el anticuerpo anti-Penta-His con acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, a 40 µg/ml antes de la inyección a un caudal de 5 µl/min para lograr aproximadamente 6500 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del ligando, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Posteriormente, se captura el receptor Fc durante 60 s a 4 o 10 nM. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones seriadas por cuadruplicado de la molécula de unión a antígeno biespecífica (intervalo entre 500 nM y 4000 nM) en HBS-EP (GE Healthcare, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4) a 25 °C a un caudal de 30 µl/min durante 120 s.

55 Para determinar la afinidad por el antígeno diana, se capturan las moléculas de unión a antígeno biespecíficas por un anticuerpo específico anti-Fab humano (GE Healthcare) que se inmoviliza en una superficie de chip de sensor CM5 activado como se describe para el anticuerpo anti-Penta-His. La cantidad final de proteína acoplada es de aproximadamente 12000 UR. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas se capturan durante 90 s a 300 nM. Se pasan los antígenos diana a través de cubetas de lectura durante 180 s a un intervalo de concentración de 250 a 1000 nM con un caudal de 30 µl/min. Se supervisa la disociación durante 180 s.

65 Se corrigen las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en la cubeta de lectura de referencia. Se usó la respuesta de estado estacionario para derivar la constante de disociación K_D por ajuste de curva no lineal de la isoterma de unión de Langmuir. Se calculan las velocidades de asociación (k_{as}) y velocidades de disociación (k_{dis}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno simple (programa informático de evaluación BIAcore® T100 versión 1.1.1) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y

disociación. Se calcula la constante de disociación en equilibrio (K_D) como la proporción k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

Ensayos de actividad

5 Se puede medir la actividad biológica de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención por diversos ensayos como se describe en los ejemplos. Las actividades biológicas pueden incluir, por ejemplo, la inducción de proliferación de linfocitos T, la inducción de señalización en linfocitos T, la inducción de expresión de marcadores de activación en linfocitos T, la inducción de secreción de citocinas por linfocitos T, la inducción de lisis de células diana tales como células tumorales y la inducción de regresión tumoral y/o la mejora de la supervivencia.

Composiciones, formulaciones y vías de administración

15 En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos siguientes. De acuerdo con la invención, una composición farmacéutica comprende las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un modo de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

25 Se proporciona además un procedimiento de producción de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención en una forma adecuada para su administración *in vivo*, comprendiendo el procedimiento (a) obtener una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, y (b) formular la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, con lo que se formula una preparación de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su administración *in vivo*.

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T disuelta o dispersada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son en general no tóxicas para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, es decir, no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción indeseable cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y opcionalmente un ingrediente activo adicional será conocida para los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para administración animal (por ejemplo, humana), se entenderá que las preparaciones deben cumplir las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza como se requiere por la Oficina de normas biológicas de la FDA o las autoridades correspondientes en otros países. Las composiciones preferentes son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, antioxidantes, proteínas, fármacos, estabilizantes de fármacos, polímeros, geles, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, tintes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como se conocerá por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

La composición puede comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o aerosol, y si es necesario que sea estéril para dichas vías de administración como inyección. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T (y cualquier agente terapéutico adicional) se pueden administrar por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intraesplénica, intrarrenal, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada bañando células diana directamente, por medio de un catéter, por medio de un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o por otro procedimiento o cualquier combinación de lo anterior como sería conocido para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a Ed. Mack Printing Company, 1990). La administración parenteral, en particular inyección intravenosa, se usa más comúnmente para administrar moléculas polipeptídicas tales como las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención.

Las composiciones parenterales incluyen las diseñadas para administración por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para inyección, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De forma alternativa, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes de su uso. Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados a continuación, según se requiera. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. En general, se preparan dispersiones incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsión inyectables estériles, los procedimientos preferentes de preparación son técnicas de secado al vacío o liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de un medio líquido previamente filtrado estéril del mismo. El medio líquido se debe tamponar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido se debe volver isotónico en primer lugar antes de la inyección con solución salina o glucosa suficiente. La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas se debe mantener al mínimo en un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener compuestos que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones inyectables oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleatos de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Se pueden atrapar ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences (18.^a ed. Mack Printing Company, 1990). Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. En modos de realización particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable se puede conseguir por el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

Además de las composiciones descritas previamente, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T también se pueden formular como preparación de liberación lenta. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T se pueden formular con materiales hidrófobos o poliméricos adecuados (por ejemplo, como emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se pueden fabricar por medio de procedimientos de mezclado, disolución, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o coadyuvantes fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de las proteínas en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T se pueden formular en una composición en forma de ácido o base libre, neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que conservan sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Estas 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 dichos ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las correspondientes formas de base libre.

Procedimientos y composiciones terapéuticos

Se puede usar cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento en procedimientos terapéuticos. Se pueden usar moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención como agentes inmunoterápicos, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres.

Para su uso en procedimientos terapéuticos, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de una manera coherente con las buenas prácticas médicas. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos.

En un aspecto, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención para su uso como medicamento. En otros aspectos, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En determinados modos de realización, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento. En un modo de realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesita el mismo. En determinados modos de realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T. En determinados modos de realización, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo. En un modo de realización particular, la enfermedad es cáncer. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad que se va a tratar es cáncer. En otros modos de realización, la divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento para su uso en la inducción de lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral. En determinados modos de realización, la divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso en un procedimiento de inducción de lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para inducir la lisis de una célula diana. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un mamífero, preferentemente un ser humano.

En determinados modos de realización, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo, en particular cáncer. Los ejemplos no limitantes de cánceres 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 de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, neoplasia hemática, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, cáncer de huesos y cáncer de riñón. Otros trastornos de proliferación celular que se pueden tratar usando una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, neoplasias localizadas en el(los)/la(s): abdomen, hueso, mama, aparato digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenal, paratiroidea, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroidea) ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, aparato genital femenino, piel, tejidos blandos, bazo, región torácica y sistema urogenital. También se incluyen afecciones o lesiones precancerosas y metástasis de cáncer. En determinados modos de realización, el cáncer se elige del grupo que consiste en 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 de páncreas, cáncer de ovario. En un modo de realización, el cáncer es un tumor sólido. En un modo de realización, el cáncer es un cáncer positivo para HER2 (es decir, un cáncer que expresa HER2). En un modo de realización particular, el cáncer es cáncer de mama, en particular cáncer de mama positivo para HER2. En otro modo de realización, el cáncer es cáncer gástrico, en particular cáncer gástrico positivo para HER2. Todavía en otro modo de realización, el cáncer es cáncer colorrectal, en particular cáncer colorrectal positivo para HER2. Un experto en la técnica reconoce fácilmente que en muchos casos es posible que la molécula de unión a

antígeno biespecífica activadora de linfocitos T no proporcione una cura sino que es posible que solo proporcione un beneficio parcial. En algunos modos de realización, un cambio fisiológico que tiene algún beneficio también se considera terapéuticamente beneficioso. Por tanto, en algunos modos de realización, una cantidad de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que proporciona un cambio fisiológico se considera una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz". El sujeto, paciente o individuo que necesita tratamiento es típicamente un mamífero, más específicamente un ser humano.

En algunos modos de realización, una cantidad eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención se administra a una célula. En otros modos de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención se administra a un individuo para el tratamiento de enfermedad.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención (cuando se usa sola o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, la vía de administración, el peso corporal del paciente, el tipo de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, la gravedad y evolución de la enfermedad, si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, intervenciones terapéuticas previas o coincidentes, la anamnesis y respuesta del paciente a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y el criterio del médico especialista. El profesional responsable para su administración determinará, en cualquier caso, la concentración del/de los ingrediente(s) activo(s) en una composición y la(s) dosis apropiada(s) para el sujeto individual. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación incluyendo, pero sin limitarse a, administraciones individuales o múltiples durante diversos puntos temporales, administración por inyección intravenosa rápida e infusión pulsada.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg - 10 mg/kg) de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede ser una dosificación candidata inicial para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento en general se mantendría hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T sería en el intervalo de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable en los mismos. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en el presente documento, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc., en base a los números descritos anteriormente. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo, aproximadamente seis dosis de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T). Se puede administrar una dosis de carga mayor inicial, seguido de una o más dosis menores. Sin embargo, otras pautas posológicas pueden ser útiles. La evolución de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se usarán en general en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido. Para su uso para tratar o prevenir un estado de enfermedad, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención, o composiciones farmacéuticas de las mismas, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, en especial a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para la administración sistémica, se puede estimar inicialmente una dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos *in vitro*, tales como ensayos de cultivo celular. A continuación se puede formular una dosis en modelos

animales para lograr un intervalo de concentración en circulación que incluye la CI_{50} como se determina en cultivo celular. Se puede usar dicha información para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos.

5 También se pueden estimar dosificaciones iniciales a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que son bien conocidas en la técnica. Un experto en la técnica podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos en base a los datos en animales.

10 La cantidad e intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles plasmáticos de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que sean suficientes para mantener un efecto terapéutico. Las dosificaciones de paciente habituales para administración por inyección varían de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg/día, típicamente de aproximadamente 0,5 a 1 mg/kg/día. Se pueden lograr niveles plasmáticos terapéuticamente eficaces administrando dosis múltiples cada día. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por HPLC.

15 En los casos de administración local o captación selectiva, es posible que la concentración local eficaz de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T no esté relacionada con la concentración plasmática. Un experto en la técnica podrá optimizar dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin experimentación excesiva.

20 Una dosis terapéuticamente eficaz de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento proporcionará en general beneficio terapéutico sin provocar toxicidad sustancial. La toxicidad y la eficacia terapéutica de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivo celular o animales de experimentación. Se pueden usar ensayos de cultivo celular y estudios en animales para determinar la DL_{50} (la dosis letal para un 50 % de una población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en un 50 % de una población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que se puede expresar como la proporción DL_{50}/DE_{50} . Son preferentes las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que presentan índices terapéuticos grandes. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la presente invención presenta un índice terapéutico alto. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificaciones adecuadas para su uso en seres humanos. Preferentemente, la dosificación se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, la forma de dosificación empleada, la vía de administración utilizada, la afección del sujeto y similares. La formulación exacta, vía de administración y dosificación se pueden elegir por el médico individual en vista de la afección del paciente (véase, por ejemplo, Finngl *et al.*, 1975, en: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, cap. 1, p. 1).

40 El médico especialista para pacientes tratados con moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención sabrá cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad, disfunción orgánica y similares. A la inversa, el médico especialista también sabrá ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuera adecuada (excluyendo la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el abordaje del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección que se va a tratar, con la vía de administración y similares. La gravedad de la afección, por ejemplo, se puede evaluar, en parte, por procedimientos de evaluación de pronóstico estándar. Además, la dosis y quizás la frecuencia de dosis también variarán de acuerdo con la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual.

Otros agentes y tratamientos

50 Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se pueden administrar en combinación con uno o más de otros agentes en el tratamiento. Por ejemplo, una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. El término "agente terapéutico" engloba cualquier agente administrado para tratar un síntoma o enfermedad en un individuo que necesita dicho tratamiento. Dicho agente terapéutico adicional puede comprender cualquier ingrediente activo adecuado para la indicación particular que se trata, preferentemente el que tiene actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. En determinados modos de realización, 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 por los inductores apoptóticos. En un modo de realización particular, el agente terapéutico adicional es un agente antineoplásico, por ejemplo, un alterador de los microtúbulos, un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasas, un intercalador de ADN, un agente alquilante, un tratamiento hormonal, un inhibidor de cinasas, un antagonista de receptores, un activador de la apoptosis de células tumorales o un agente antiangiogénico.

65 Dichos otros agentes están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de molécula de unión a

antígeno biespecífica activadora de linfocitos T usada, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empírica/clínicamente como apropiada.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma o en composiciones separadas), y la administración separada, caso en el que se puede producir la administración de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención antes de, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico y/o coadyuvante adicional. También se pueden usar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención en combinación con radioterapia.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que por sí misma o combinada con otra composición es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención. La ficha técnica o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende otro agente citotóxico o de otro modo terapéutico. El artículo de fabricación en este modo de realización de la divulgación puede comprender además un prospecto del envase que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (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 de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones de la invención. No se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención, que está definida por las reivindicaciones adjuntas.

Procedimientos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular ADN como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas humanas se da en: Kabat, E.A. *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., publicación NIH n.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

Se determinaron secuencias de ADN por secuenciación de doble hebra.

Síntesis génica

Se generaron segmentos de genes deseados, cuando se requirió, por PCR usando moldes apropiados o bien se sintetizaron por Geneart AG (Ratisbona, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR por síntesis génica automatizada. En casos donde no estaba disponible ninguna secuencia génica exacta, se diseñaron cebadores oligonucleotídicos en base a las secuencias de los homólogos más cercanos y se aislaron los genes por RT-PCR a partir del ARN que se origina en el tejido apropiado. Se clonaron los segmentos génicos flanqueados por sitios de escisión de endonucleasas de restricción singulares en vectores de clonación/secuenciación estándar. Se purificó el ADN plasmídico a partir de bacterias transformadas y se determinó la concentración por espectroscopia UV. Se confirmó la secuencia de ADN de los fragmentos génicos subclonados por secuenciación de ADN. Se diseñaron segmentos génicos con sitios de restricción adecuados

para permitir la subclonación en los respectivos vectores de expresión. Se diseñaron todas las construcciones con una secuencia de ADN del extremo 5' que codifica un péptido líder que se dirige a proteínas para su secreción en células eucariotas.

5 Ejemplo 1

Preparación de moléculas biespecíficas de linfocitos T (TCB) anti-p95HER2/anti-CD3

10 Se prepararon las siguientes moléculas en este ejemplo, las ilustraciones esquemáticas de las mismas se muestran en la figura 2:

A. "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en la proteína fijadora de CD3, modificación de carga en la proteína fijadora de p95HER2) (figura 2A, SEQ ID NO 22-25).

15 B. "2+1 IgG CrossFab, invertida" sin modificaciones de carga (intercambio CH1/CL en la proteína fijadora de CD3) (figura 2B, SEQ ID NO 26-29).

20 Las secuencias de ADN que codifican las regiones de la cadena pesada y ligera variables de las proteínas fijadoras de CD3 y p95HER2 se subclonaron dentro del marco de lectura con las respectivas regiones constantes que se preinsertan en el vector de expresión de mamífero receptor respectivo. La expresión de proteína se fomenta por un promotor de VSMP. La poliadenilación se fomenta por una secuencia señal poliA sintética localizada en el extremo 3' de CDS. Además, cada vector contiene una secuencia OriP de VEB para la replicación autosómica.

25 Para la producción de las moléculas, se cotransfectaron las células CHO-K1 que crecían en suspensión con los vectores de expresión respectivos usando eviFect (Evitria) como reactivo de transfección. Se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión en una proporción 1:2:1:1 (A: "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)"; B: "vector cadena pesada (VH-CH1-VH-CL-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VL-CL)": "vector cadena pesada (VH-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VL-CH)").

30 Para la transfección, se cultivaron células CHO-K1 en suspensión sin suero en medio de cultivo eviMake (Evitria). Después de 7 días a 37 °C en una estufa de incubación con una atmósfera de CO₂ al 5 %, se recogió el sobrenadante para su purificación por centrifugación, se esterilizó por filtración (filtro de 0,22 µm) y se mantuvo a 4 °C.

35 Se determinó el valor de las moléculas en el medio de cultivo por proteína A-HPLC (tabla 2). El cálculo del valor se basa en un procedimiento de dos etapas e incluye la unión de moléculas que contienen Fc a la proteína A a pH 8,0 y la liberación en una etapa de elución a pH 2,5. Ambos tampones usados para el análisis contenían Tris (10 mM), glicina (50 mM) y NaCl (100 mM) y se ajustaron a los respectivos pH (8 y 2,5). El cuerpo de columna fue una precolumna Upchurch de 2x20 mm con un volumen interno de ~63 µl rellena con POROS 20A. Después de la calibración inicial, se inyectaron 100 µl de cada muestra con un caudal de 0,5 ml/min. Después de 0,67 minutos, se eluyó la muestra con una etapa de pH a pH 2,5. Se realizó la cuantificación por determinación de la absorbancia a 280 nm y el cálculo usando una curva estándar con un intervalo de concentración de IgG1 humana de 16 a 166 mg/l.

45 Se purificaron las proteínas secretadas de los sobrenadantes de cultivo celular por cromatografía de afinidad usando cromatografía de afinidad con proteína A, seguido de una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño.

50 Para la cromatografía de afinidad, se cargó sobrenadante en una columna de proteína A HiTrap HP (VC=5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 25 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. Se retiró la proteína no unida lavando con al menos 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5, y se eluyó la proteína diana en 6 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0. Se neutralizó la solución de proteína añadiendo 1/10 de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0. Para el análisis en proceso después de la cromatografía con proteína A, se analizaron la pureza y el peso molecular de las moléculas en las fracciones individuales por SDS-PAGE en ausencia de un agente reductor y tinción con Coomassie (InstantBlue™, Expedeon). Se usó el sistema en gel NuPAGE® Pre-Cast (4-12 % Bis-Tris, Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las fracciones seleccionadas de la proteína diana se concentraron y filtraron antes de cargarlas en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, Tween-20 al 0,01 %, pH 6,0 (para la molécula A) o histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0 (para la molécula B).

Se determinó la concentración de proteína de las muestras de proteínas purificadas midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos.

65 Se analizó el contenido de agregado de las moléculas usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) en K₂HPO₄ 25 mM, NaCl 125 mM, monohidrato de L-arginina 200 mM, NaN₃ al

0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7 a 25 °C.

Se analizaron la pureza y el peso molecular de las moléculas después de la etapa de purificación final por análisis CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor. Se usó el sistema Caliper LabChip GXII (Caliper lifescience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (figura 3 y tabla 2).

Se realizó el análisis de espectrometría de masas de las moléculas en un sistema CL-EM de Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). El sistema de cromatografía (Agilent 1260 Infinity) se acopló a un dispositivo de ESI-CL/EM-TOF Agilent 6224. Se inyectaron aproximadamente 5 µg de muestra en una columna de 250 mm x 4,6 mm NUCLEOGEL RP1000-8, (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Alemania) a un caudal de 1 ml/min a 40 °C. La fase móvil fue como sigue A: 5 % de acetonitrilo, 0,05 % de ácido fórmico y B: 95 % de acetonitrilo, 0,05 % de ácido fórmico. Para aplicar un gradiente de elución, se elevó un 15 % de B a un 60 % de B en un período de 10 min, a continuación a un 100 % de B en 2,5 min. El espectrómetro de masas midió en modo de alta resolución 4 GHz positivo y registró un intervalo de 500 a 3200 m/z. Los espectros m/z se resolvieron manualmente con el MassAnalyzer 2.4.1 de Roche (Hoffman-La Roche, Ltd).

Las moléculas A y B se produjeron y purificaron esencialmente siguiendo el mismo procedimiento. La recuperación final fue más alta para la molécula B (13 %, véase la tabla 1), pero el análisis CL-EM de emparejamiento incorrecto de la cadena ligera reveló que solo un 10-20 % de esa molécula se ensambló correctamente. La calidad de la molécula A fue claramente mejor, con alrededor de un 95 % de molécula ensamblada correctamente en el análisis CL-EM.

El perfil de CE-SDS no reducido también fue mejor para la molécula A con menos productos secundarios que en la molécula B (tabla 2, figura 3) y la calidad final fue muy buena con un contenido de monómero de un 99 % (tabla 1). La SDS-PAGE de las fracciones después de la purificación con proteína A mostró también pocos productos secundarios para la molécula A (figura 4, este análisis no está disponible para la molécula B).

TABLA 1. Sumario de producción y purificación de moléculas TCB anti-p95HER2/anti-CD3 con y sin modificaciones de carga.

Molécula	Valor [mg/l]	Recuperación [%]	Rendimiento [mg/l]	SEC analítica (HMW/monómero/LMW) [%]
A	14	7,8	1,07	0,5/ 99 ,5/0
B	30	13	3,85	0,6/ 99 ,4/0

TABLA 2. Análisis CE-SDS (no reducido) de moléculas TCB anti-p95HER2/anti-CD3 con y sin modificaciones de carga.

Molécula	N.º pico	Tamaño [kDa]	Pureza [%]
A	1	205	96
	2	214	4
B	1	173	10
	2	190	11
	3	204	75
	4	215	4

La molécula A preparada en este ejemplo se denominará TCB para p95HER2 en lo que sigue.

Ejemplo 2

Niveles de expresión de p95HER2 en diferentes células diana y unión de TCB para p95HER2 a células diana positivas para p95HER2

Se determinó la expresión de p95HER2 en MCF10A transfectada con p95HER2 (MCF10A_p95Her2) y HCC-1954 por citometría de flujo usando el clon de IgG anti-p95HER2 32H2 (Parra-Palau *et al.*, Cancer Res 70, 8537-46 (2010)). Se determinó la expresión de p95HER2 o HER2 de diferentes células diana (MCF10A transfectadas para expresar p95HER2, HER2, ambos o bien un vector vacío) por inmunoelectrotransferencia usando un anticuerpo anti-HER2. Se sometió a prueba la unión de TCB para p95HER2 a MCF10A transfectada para expresar p95HER2, HER2 o ambos o bien un vector vacío por citometría de flujo.

Para el análisis de inmunoelectrotransferencia, se obtuvieron extractos de proteína a partir de transfectantes de MCF10A lisados. Las muestras se mezclaron con tampón de carga que contenía DTT (Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS al 10 %, glicerol al 30 %, DTT de 1,4-ditiotreitol 0,5 mM (Roche, n.º 10780984001), azul de bromofenol al 0,2 %) y se incubaron a 99 °C durante 5 min antes de resolver las proteínas por SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y transferirlas a membranas de nitrocelulosa. Se detectaron las proteínas por autorradiografía tras la adición de sustrato de HRP quimioluminiscente de inmunoelectrotransferencia Immobilon (n.º WBKLS0500, Millipore). Se usó HER2 (c-erbB-2) (CB11) (monoclonal de ratón, 1:1000), (n.º MU134-UCE, BioGenex) como anticuerpo primario. Anticuerpo secundario: IgG de ratón ECL, Ab completo unido a HRP (1:4000) (Amersham GE Healthcare, n.º NA931). Para el análisis de la unión de TCB para p95HER2 por citometría de flujo, se obtuvieron transfectantes de MCF10A con StemPro Accutase (Invitrogen, n.º A11105-01) y se incubaron con TCB para p95HER2 durante una hora antes de la tinción con un anticuerpo secundario anti-Alexa488 humano durante 30 min. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Se determinaron los niveles de expresión en MCF10A_p95HER2 y HCC-1954 por tinción de las células con el clon anti-p95HER2 32H2 durante 30 min a 4 °C seguido de tinción con anticuerpo caprino anti-IgG de ratón conjugado con FITC (AbD Serotec) durante 30 min a 4 °C. Se midió la fluorescencia usando un BD FACS Cantoll.

La inmunoelectrotransferencia de los transfectantes de MCF10A verificó la expresión de p95HER2, HER2 o la combinación (figura 5A). Se incubaron las células mostradas en la figura 5A con 2 µg/ml de TCB para p95HER2 y se analizaron por citometría de flujo (figura 5B). Hubo una unión apreciable de TCB para p95HER2 a p95HER2 y p95HER2-HER2 que expresaba MCF10A detectable, mientras que no hubo unión a células MCF10A-vector. La figura 5C muestra la comparación de los niveles de expresión de p95HER2 en células MCF10A_p95Her2 y HCC-1954 analizadas por citometría de flujo. MCF10A_p95Her2 expresó aproximadamente p95HER2 5x mayor en la superficie celular en comparación con la línea celular HCC-1954 derivada de glándula mamaria que sobreexpresa HER2 (ATCC, CRL-2238).

Ejemplo 3

Lisis de transfectantes de MCF10A y HCC-1954 y posterior activación de linfocitos T mediada por TCB para p95HER2

Se evaluó la lisis de células diana y la posterior activación de linfocitos T mediada por TCB para p95HER2 usando MCF10A_p95Her2, MCF10A_Her2, MCF10A_p95Her2-Her2 y MCF10A_vector así como HCC-1954. Se usaron PBMC humanas como efectoras y se detectó la lisis tumoral a las 46-48 h de incubación con TCB para p95HER2 o una TCB de control no dirigida. En resumen, se obtuvieron las células diana con StemPro Accutase o bien con tripsina/EDTA, se lavaron y se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhieran durante la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por centrifugación por densidad en Histopaque de preparaciones de linfocitos enriquecidas (capas leucocíticas) o sangre heparinizada fresca obtenida de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre fresca con PBS estéril y se colocó en capas sobre un gradiente de Histopaque o Ficoll-Paque. Después de la centrifugación (450 x g o 400 x g, 30 minutos, temperatura ambiente, sin interrupción), se descartó el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC y se transfirieron las PBMC a un nuevo tubo Falcon posteriormente llenado con PBS. La mezcla se centrifugó (400 x g durante 5 min o 350 x g durante 10 min a temperatura ambiente, con interrupción), se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento de PBMC dos veces con PBS estéril. Se contó la población de PBMC resultante y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO₂ al 5 % en una estufa de incubación de células hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de lisis tumoral, se añadieron TCB para p95HER2 o TCB de control a las concentraciones indicadas (intervalo de 1 pM - 100 nM por triplicado). Se añadieron PBMC a células diana a una proporción E:T final de 10:1. Se evaluó la lisis de las células tumorales después de 46-48 h de incubación a 37 °C, CO₂ al 5 % por cuantificación de LDH liberada en los sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001 o ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96, Promega, n.º G1780). Se logró la lisis máxima de las células diana (= 100 %) por incubación de células diana con Triton X-100 al 1 %. Lisis mínima (= 0 %) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin construcción biespecífica. Para la evaluación de la activación de linfocitos T que se produce tras la lisis de células tumorales, se transfirieron PBMC a una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se centrifugó a 400 x g durante 4 min y se lavó con PBS que contenía BSA al 0,1 %. Se realizó la tinción de superficie para CD8 (anti-CD8 humano APCCy7, Biolegend n.º 301016), CD4 (anti-CD4 humano FITC, Biolegend n.º 300506), CD69 (anti-CD69 humano BV421, Biolegend n.º 310930) y CD25 (anti-CD25 humano PECy7, Biolegend n.º 302612) de acuerdo con las indicaciones de los proveedores. Se lavaron las células dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 % y se fijaron usando PFA al 2 %. Se analizaron las muestras usando un BD FACS Cantoll.

La determinación de la lisis de células MCF10A que expresan de forma estable el vector, p95HER2, HER2 o la combinación después de 48 horas de incubación con PBMC y concentraciones crecientes de anticuerpo TCB frente a p95HER2 no mostró lisis de la línea celular de control negativo para p95HER2 MCF10A_vector y solo una lisis muy escasa de las células MCF10A_Her2 (figura 6). En contraste con eso, hubo una lisis apreciable de las células diana MCF10A_p95Her2 y MCF10A_p95Her2-Her por TCB para p95HER2 detectable. Estos resultados muestran que TCB para p95HER2 induce la lisis de células tumorales específicas de diana.

La lisis de MCF10A_p95Her2 (figura 7A) y HCC-1954 (figura 7C) después de la incubación durante 46 horas con PBMC (efectora:diana 10:1) y concentraciones crecientes de TCB para p95HER2 mostró una lisis apreciable de células diana MCF10A_p95Her2 (CE50 370 pM, liberación máxima 70 %). No hubo lisis inducida por la TCB de control no dirigida. Para las células HCC-1954 que expresan p95HER2 5x menor que MCF10A_p95Her2, TCB mostró cierta lisis de células tumorales (hasta un 40 %) a concentraciones de TCB para p95HER2 altas (25 - 100 nM). No se pudo determinar la CE50. De nuevo, no hubo lisis detectable por la TCB no dirigida. Además, no hubo lisis de la línea celular de control negativo MCF10A_vector (figura 7B). Estos resultados sugieren que la eficacia de la lisis de células tumorales mediada por TCB para p95HER2 depende del nivel de expresión de p95HER2. Las células que expresan naturalmente p95HER2 en cantidades menores también son dianas adecuadas, mientras que las células negativas para p95HER2 no se lisan.

La expresión de CD25 y CD69 en linfocitos T CD4+ (figura 8) y linfocitos T CD8+ (figura 9) tras la destrucción de MCF10A que expresa p95HER2 o vector o HCC-1954 después de 46 horas mediada por TCB para p95HER2 se muestra en las figuras 8 y 9. En consonancia con la lisis de células tumorales (figura 7), hubo una activación de linfocitos T apreciable detectable tras la lisis de células MCF10A_p95Her2 mediada por TCB para p95HER2. Los linfocitos T tanto CD4+ como CD8+ regularon por incremento CD25 y CD69 dependiendo de la concentración de TCB. Mientras que TCB para p95HER2 indujo cierta lisis de HC-1954 (figura 7C), no hubo activación de linfocitos T específica detectable en comparación con la línea celular de control negativo MCF10A_vector.

Ejemplo 4

Lisis de cardiomiocitos y posterior activación de linfocitos T inducida por TCB para p95HER2 en comparación con TCB para HER2

Se determinó la unión de TCB para p95HER2 y TCB para HER2 (SEQ ID NO 24, 31, 32 y 33; estructura análoga a TCB para p95HER2) a cardiomiocitos y transfectantes de MCF10A antes de los ensayos de actividad funcional usando estos tipos de células como dianas para ambas TCB (figura 10). Se investigó la inducción de la señalización de CD3 en Jurkat NFAT (figura 11), así como la lisis de cardiomiocitos en comparación con las células MCF10A_p95Her2 (figura 12) y la posterior activación de linfocitos T (figura 13) mediada por TCB para p95HER2 o TCB para HER2.

Para determinar la unión de las TCB, se cultivaron cardiomiocitos (cardiomiocitos iCell, Cellular Dynamics n.º CMC-100-110-00) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Después de 10 días de cultivo, se obtuvieron los cardiomiocitos así como los transfectantes de MCF10A con tampón de disociación celular y se tiñeron con TCB para p95HER2 20 nM o TCB para HER2 durante 30 min a 4 °C. Después del lavado, se añadió a las células una dilución 1:20 de fragmento F(ab')₂ de anticuerpo caprino anti-IgG humana, Fcg específico de fragmento AffiniPure (Jackson Immuno Research Lab n.º 109-606-098) conjugado con AF647 durante 30 min a 4 °C en la oscuridad. Después del lavado, se resuspendieron las células en tampón FACS que contenía PI para excluir las células muertas de la siguiente medición por citometría de flujo. En paralelo al experimento de unión, se usaron cardiomiocitos cultivados durante 10 días en placas de 96 pocillos como dianas para determinar la señalización de CD3, la lisis de células diana y la activación de linfocitos T. En resumen, dos días antes del ensayo de señalización de CD3, se obtuvieron MCF10A_p95Her2 con tampón de disociación celular y se sembraron (25000 células por pocillo) en las mismas placas junto a los cardiomiocitos. Después de 2 días, se obtuvieron células Jurkat-NFAT-luc y se añadieron 100000 células a las células diana sembradas. Después de la adición de TCB para p95HER2 o TCB para HER2 (0,4 pM - 100 nM, volumen final 100 µl/pocillo), se incubaron las células durante 5,5 h a 37 °C en la estufa de incubación. Se transfirieron 100 µl/pocillo de suspensión celular que contenía las células Jurkat-NFAT-luc no adheridas a placas de 96 pocillos de paredes blancas y se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato One Gio (Promega) a las células. Después de 5 min de incubación a TA, se determinó la luminiscencia usando un Victor Wallac Pro. Un día antes de la lisis de células diana y el ensayo de activación de linfocitos T, se obtuvieron MCF10A_p95Her2 con tampón de disociación celular y se sembraron (25000 células por pocillo) en las mismas placas junto a los cardiomiocitos. Se añadieron PBMC aisladas como se describe en el ejemplo 3 con una proporción E:T final de 10:1. Se diluyeron TCB en medio de ensayo (RPMI1640 + FCS al 2 % + Glutamax al 1 %) y se añadieron a las células. Se evaluó la lisis de células diana después de 47 h de incubación a 37 °C, CO₂ al 5 % por cuantificación de LDH liberada en sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). Se logró la lisis máxima de las células diana (= 100 %) por incubación de células diana con Triton X-100 al 1 %. Lisis mínima (= 0 %) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin construcción bispecifica. Para la evaluación de la activación de linfocitos T que se produce tras la lisis de células tumorales, se transfirieron PBMC a una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se centrifugó a 400 x g durante 4 min y se lavó con PBS que contenía BSA al 0,1 %. Se realizó la tinción de superficie para CD8 (anti-CD8 humano APC, BD n.º 55536), CD4 (anti-CD4 humano FITC, Biolegend n.º 300506), CD69 (anti-CD69 humano BV421, Biolegend n.º 310930) y CD25 (anti-CD25 humano PECy7, Biolegend n.º 302612) de acuerdo con las indicaciones de los proveedores. Se lavaron las células dos veces con 150 µl/pocillo de tampón FACS y se fijaron usando solución de lisis BD FACS. Se analizaron las muestras usando un BD FACS Cantoll.

La figura 10 muestra la unión de p95HER2-TCB, HER2-TCB y TCB de control no dirigida en MCF10A_p95Her2, MCF10A_vector, MCF10A_Her2 y cardiomiocitos analizada por citometría de flujo. TCB para HER2 mostró una unión apreciable a cardiomiocitos en contraste con TCB para p95HER2.

5 La figura 11 muestra la estimulación con CD3 de células Jurkat NFAT mediada por TCB para p95HER2 o TCB para HER2 en presencia de cardiomiocitos. En contraste con TCB para p95HER2, TCB para HER2 indujo una señalización apreciable de CD3 en Jurkat-NFAT-luc usando cardiomiocitos como células diana en contraste con TCB para p95HER2.

10 La figura 12 muestra la lisis de células MCF10A que expresan de forma estable p95HER2 y cardiomiocitos después de la incubación durante 47 horas con PBMC (proporción efectora:diana 10:1) y con concentraciones crecientes de TCB para p95HER2 o TCB para HER2. TCB para HER2 indujo una lisis apreciable de células MCF10A_Her2 así como de cardiomiocitos, en contraste con TCB para p95HER2 que solo indujo lisis detectable de dianas MCF10A_p95Her2.

15 La figura 13 muestra el nivel de expresión de CD25 en linfocitos T CD4+ y CD8+ tras la lisis de MCF10A_p95Her2 y cardiomiocitos después de la incubación durante 47 horas con PBMC (proporción efectora:diana 10:1) y concentraciones crecientes de TCB para p95HER2 o TCB para HER2. TCB para HER2 indujo una activación de linfocitos T apreciable tras la lisis de células MCF10A_Her2, así como de cardiomiocitos, en contraste con TCB para p95HER2, que solo indujo una activación de linfocitos T detectable en presencia de células diana MCF10A_p95Her2 pero no de cardiomiocitos.

20 Estos resultados *in vitro* sugieren que TCB para p95HER2 podría dar lugar a una reducción de los problemas cardíacos *in vivo* en comparación con TCB para HER2.

25

Ejemplo 5

Modelos de PDX (xenoinjerto derivado del paciente) *in vitro* e *in vivo* para la caracterización de TCB para p95HER2

30

Los tumores de mama humanos usados en este estudio procedían de resecciones quirúrgicas en el Hospital Universitario de Vail d'Hebron (España) y se obtuvieron siguiendo las directrices institucionales. Las juntas de revisión institucional (IRB) del Hospital Vail d'Hebron aprobaron este estudio de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito para la realización de estudios moleculares de tumor de todos los pacientes que proporcionaron tejido. Para los PDX de cáncer de mama, se implantaron fragmentos de muestras de pacientes en el cuerpo adiposo número cuatro de los ratones. Se añadieron 17 β -estradiol (1 μ M) (Sigma-Aldrich) y Baytril al agua para consumo. Se adquirieron ratones NOD.CB17-Prkdcscid (NOD/SCID) de Charles River Laboratories (París, Francia). Para el establecimiento de cultivos celulares derivados de PDX, se extirparon los tumores y se cortaron en trozos lo más pequeños posibles con bisturí, se incubaron durante 30 minutos con colagenasa IA (Sigma-Aldrich, n.º C9891-1G), se lavaron y se resuspendieron en DMEM:F-12, SFB al 10 %, 4 mmol/l de L-glutamina, penicilina/estreptomicina (n.º P4333-Gibco), HEPES 10 mM (Santa Cruz Biotechnology, n.º sc-286961) y 1,75 μ g/ml de anfotericina B (Gibco, n.º 15240062) durante 6 horas. A continuación, se retiró el medio cuidadosamente y se cambió a medio humano Mammocult complementado con SFB al 10 % (StemCell Technologies, n.º 5620) con penicilina/estreptomicina, HEPES 10 mM y 1,75 μ g/ml de anfotericina B durante una semana para facilitar el crecimiento de células epiteliales con respecto a los fibroblastos de ratón contaminantes. Se usaron células de PDX positivas y negativas para p95HER2 como dianas para la lisis *in vitro* mediada por TCB para p95HER2. En resumen, se incubaron las células diana con PBMC (E:T 10:1) y TCB para p95HER2 durante 48 h a 37 °C, CO₂ al 5 % en una estufa de incubación humidificada. Se determinó la liberación de LDH con el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96 (Promega, n.º G1780). Se añadieron 20 μ l de solución de lisis a los controles de máxima liberación 45 minutos antes del ensayo. Después de los 45 min, cada placa de 96 pocillos se centrifugó durante 5 min a 420 x g y se transfirieron 50 μ l de cada sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos. Se añadieron 50 μ l de reactivo CytoTox a cada pocillo y se incubó la placa durante 30 min, a TA protegida de la luz. A continuación, se añadieron 50 μ l de solución de parada y se midió la absorbancia a 490 nm. Se restó el fondo del medio de cultivo de cada medida. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como sigue: % citotoxicidad = (abs. experimental - abs. espontánea de efectora - abs. espontánea de diana) / (abs. máxima de diana - abs. espontánea de diana). Para las pruebas *in vivo* de TCB para p95HER2, se implantaron tumores PDX173 como se describe previamente en ratones NOD.Cg-Prkdcscid I12rgtm1WjFSzJ (Charles River Laboratories, París, Francia). Cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 150-200 mm³, se les inyectó a los ratones NSG por vía intraperitoneal 10 x 10⁶ PBMC resuspendidas en 200 μ l de 1 x PBS. Se midieron los xenoinjertos de tumores con compases calibradores 3 veces por semana y se determinó el volumen del tumor usando la fórmula: (longitud x ancho²) x (pi/6). Se supervisó el peso corporal dos veces por semana. Al final de los estudios *in vivo*, se pesaron los tumores y a continuación se extirparon. Para generar suspensiones de células individuales, se cortaron los tumores en trozos pequeños y se pasaron a un tubo de 50 ml que contenía 50 μ l de colagenasa (100 mg/ml) y 50 μ l de DNasa (2 mg/ml) en 5 ml de medios RPMI. Esto se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se filtró la mezcla en un tamiz celular de 100 μ y a continuación se centrifugó durante 5 min a 400 x g. A continuación, se realizó la lisis de eritrocitos y después de un lavado con PBS, se resuspendieron las células en

65

PBS, EDTA 2,5 mM, BSA al 1 % y suero de caballo al 5 %. Veinte minutos más tarde, se centrifugaron las muestras y se incubaron las células durante 45 min con la siguiente mezcla de anticuerpos: huCD45-PE, clon HI30, (n.º 304008); msCD45AF488, clon 30-F11 (n.º 103122); huCD3Perpcy5.5, clon UCHT1 (n.º 300430); CD8 PE-Cy7, clon SK1 (n.º 344712); CD4BV421, clon OKT4 (n.º 317434); todos usados en diluciones 1:300 (todos de BioLegend). Después de un lavado con PBS, se adquirieron las muestras en un LSR Fortessa (BD Bioscience). Los datos se analizaron en el programa informático FlowJo.

La figura 14A muestra la inmunohistoquímica con el anticuerpo frente a p95HER2 de PDX positivos para p95HER2 y negativos para p95HER2 a partir de los que se generaron cultivos primarios. Los cultivos primarios de PDX como se muestra en la figura 14A y de un PDX de cáncer de mama triple negativo (CMTN) se incubaron con 2 µg/ml de p95HER2-TCB y se analizaron por citometría de flujo (figura 14B).

Los cultivos primarios de PDX como se muestra en la figura 14A se incubaron con PBMC (efectora:diana=10:1) y con concentraciones crecientes de TCB para p95HER2 durante 48 horas (figura 14C). La lisis celular se determinó por liberación de LDH. El PDX67 positivo para p95HER2 se lisó a altas concentraciones de TCB para p95HER2 en presencia de PBMC mientras que no hubo lisis de PDX118 negativo para p95HER2. Estos resultados confirman la lisis específica del antígeno diana por TCB para p95HER2.

La figura 15A muestra el flujo de trabajo experimental para las pruebas *in vivo* de TCB para p95HER2. PDX173, p95HER2+, se implantó en el cuerpo adiposo mamario de ratones NSG. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 200 mm³ se humanizaron los animales con 10⁷ PBMC recién aisladas y se aleatorizaron en los 4 grupos experimentales. Los tratamientos comenzaron 48 h después de la inyección de PBMC. La figura 15B muestra la media del cambio porcentual en el volumen del tumor para cada uno de los grupos experimentales y para animales individuales. La figura 15C y 15D muestran los pesos de los tumores al final del experimento, prueba de la *t*, **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001; ns, no significativo. Tanto trastuzumab como TCB para p95HER2 redujeron significativamente el tamaño del tumor en los ratones tratados.

La figura 16 AD muestra la determinación de células inmunitarias infiltrantes de tumor. Se extirparon los tumores y se tiñeron suspensiones de células individuales con una mezcla de anticuerpos que contenía: msCD45, huCD45, huCD3, huCD4 y huCD8. Las muestras se analizaron por citometría de flujo, prueba de la *t*, **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001; ns, no significativo. La figura 16E muestra el porcentaje de huCD8 en muestras de tumor FFPE determinado por análisis inmunohistoquímico. El tratamiento con TCB para p95HER2 y con trastuzumab dio lugar a una infiltración potenciada de células CD45, así como de linfocitos T CD8+ y CD4+ en los tumores.

Ejemplo 6

Efecto de TCB para p95HER2 sobre el crecimiento de xenoinjertos de células que expresan p95HER2 y de un xenoinjerto derivado del paciente (PDX)

Material y procedimientos

Líneas celulares

Se obtuvieron MCF7 del patrón ATCC-LGC y se mantuvieron a 37 °C y CO₂ al 5 % dentro del medio esencial mínimo de Dulbecco: F12 (DMEM:F12) (1:1) n.º 21331-046 (Gibco-Life Technologies, Rockville, MD, EE. UU.) complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % n.º 10270-106 (Gibco-Life Technologies) y L-glutamina al 1 % (n.º M11-004 (PAA Laboratories-GE Healthcare, Pasching, Austria). La línea celular MCF7 TetOn-p95HER2 se generó por transducción lentivírica de pInducer-p95HER2. En resumen, se clonó la secuencia de p95HER2 en el vector de doble selección pENTRIA de Invitrogen, usando sitios de restricción BglII/BamHI (5') y NotI (3'), y se usó como vector de entrada para introducir la secuencia en el vector de destino pInducer20-Neo-Luc (n.º 44012, Addgene) usando la reacción LR de Gateway. Se seleccionó la población policlonal y se mantuvo con 200 µg/ml de Geneticin. Se generaron las líneas celulares MCF7 doble TetOn para p95HER2 y shp21 o p95HER2 y sh-nt por transducción lentivírica del MCF7 TetOn-p95HER2 previamente generado con pTRIPz-shp21 o pTRIPz-vector vacío. En resumen, se retiró la secuencia de horquilla corta para dirección de ARNm de p21 (NM_000389) del ARNhc de pGIPZ CDKN1A de Open Biosystems-Thermo Scientific (RHS4430-200281172 clon V3LHS-322234) usando enzimas de restricción XhoI y MluI, y se insertó en los mismos sitios del vector pTRIPz (Open Biosystems, Thermo Scientific) usando técnicas de clonación estándar. Se seleccionó la población policlonal durante al menos 48 h con 1 µg/ml de puomicina, la población de doble resistencia se mantuvo con 200 µg/ml de Geneticin y 1 µg/ml de puomicina.

Ensayo de proliferación

Se analizó la proliferación por recuento de células. En resumen, se sembraron 1 x 10⁵ células por pocillo en placas de 6 pocillos. En los tiempos indicados: 0 (se contaron 10 h como tiempo 0), 24 h, 48 h, 72 h y 144 h se separaron células con tripsina-EDTA y se determinaron las células viables por exclusión de tinte azul tripano y se contaron en una cámara de Neubauer.

Ensayo in vivo en xenoinjerto de MCF7-p95HER2

Se les inyectaron de forma ortotópica a los ratones NSG 3 x 10⁶ células con sh-p21 de MCF7 Tet-On-p95HER2. Una vez que los tumores alcanzaron 200 mm³ se les inyectaron a los animales 1 x 10⁷ PBMC obtenidas de donantes sanos. Después de 48 h, se comenzó a tratar a los animales dos veces por semana con 2,5 mg/kg de TCB para p95HER2 (i.v.). Se mantuvo a los animales con presencia de doxiciclina (1 g/l) en el agua de consumo.

Ensayo in vivo en xenoinjerto derivado del paciente (PDX)

Los tumores humanos usados para establecer PDX procedían de biopsias o resecciones quirúrgicas en el Hospital Universitario de Vail d'Hebron (España) y se obtuvieron siguiendo las directrices institucionales. Las juntas de revisión institucional (IRB) del Hospital Vail d'Hebron aprobaron este estudio. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito para la realización de estudios moleculares de tumor de todos los pacientes que proporcionaron tejido.

Se implantaron fragmentos de muestras de tumor de pacientes en el cuerpo adiposo número cuatro de NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1wjl}/SzJ (NSG) (Charles River Laboratories (París, Francia). Se añadieron 17 β-estradiol (1 μM) (#E8875-1G, Sigma-Aldrich) y Baytril al agua para consumo. Se midieron los xenoinjertos de tumores con compases calibradores tres veces por semana y se determinó el volumen del tumor usando la fórmula: (longitud x ancho²) x (pi/6). Se supervisó el peso corporal dos veces por semana. Una vez que los tumores alcanzaron una media de 250 mm³, se aleatorizaron los ratones en los grupos experimentales y se inyectaron 10⁷ PBMC obtenidas de donantes sanos a los ratones (i.p.). Los tratamientos se iniciaron 48 h después de las inyecciones de PBMC.

Infiltración de células inmunitarias en tumores

Al final de los estudios *in vivo*, se pesaron los tumores y a continuación se extirparon. Para generar suspensiones de células individuales, se cortaron los tumores en trozos pequeños y se pasaron a un tubo de 50 ml que contenía 50 μl de colagenasa (100 mg/ml) y 50 μl de DNasa (2 mg/ml) en 5 ml de medios RPMI. Esto se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se filtró la mezcla en un tamiz celular de 100 μm y a continuación se centrifugó durante 5 min a 400 g. A continuación, se realizó la lisis de eritrocitos y después de un lavado con 1x PBS, se resuspendieron las células en 1 x PBS, EDTA 2,5 mM, BSA al 1 % y suero de caballo al 5 %. Veinte minutos más tarde, se centrifugaron las muestras y se incubaron las células durante 45 min con la siguiente mezcla de anticuerpos: huCD45-PE, clon HI30, (n.º 304008); msCD45AF488, clon 30-F11 (n.º 103122); huCD3Percpcy5.5, clon UCHT1 (n.º 300430); CD8 PE-Cy7, clon SKI (n.º 344712); CD4BV421, clon OKT4 (n.º 317434); todos usados en diluciones 1:300 (todos de BioLegend). Después de un lavado con 1 x PBS, se adquirieron las muestras en un LSR Fortessa (BD Bioscience). Los datos se analizaron en el programa informático FlowJo.

Inmunohistoquímica (IHQ)

Las muestras de tumor se fijaron en formaldehído al 4 % (n.º 2529311315, Panreac) y a continuación se incluyeron en parafina. Las tinciones se realizaron en cortes de parafina de 5 μm en una máquina Dako Autostainer Plus (Dako) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Anticuerpos: clon SP57 anti-CD8 (monoclonal de conejo) (n.º 5937248001, Ventana, Roche). Patólogos certificados cuantificaron el porcentaje de CD8 en muestras de tumor, anti-citoqueratina humana (ratón, monoclonal), clones AE1/AE3 (n.º M3515, Dako).

Resultados

La figura 17 muestra el efecto de TCB para p95HER2 sobre el crecimiento de xenoinjertos de células que expresan p95HER2.

Las células MCF7 se transdujeron de forma estable con p95HER2 bajo el control de un promotor inducible por doxiciclina y un ARNhc no dirigido (sh-NT) o un ARNhc dirigido a p21 (sh-p21) bajo el control de un promotor inducible por doxiciclina independiente (figura 17A). Como se mostró previamente (Angelini *et al.*, Cancer Res 73, 450-8 (2013)), la expresión de p95HER2 en las células MCF7 de control da lugar a la senescencia inducida por oncogén y, por tanto, a la inhibición de la proliferación celular (figura 17B, sh-NT +Dox) y un profundo cambio morfológico (figura 17C, sh-NT +Dox). La modulación a la baja de p21 supera la senescencia (figura 17B, sh-p21; figura 17C, shp21).

La figura 17D muestra el efecto de TCB para p95HER2 sobre el crecimiento de células MCF7 p95HER2 como xenoinjertos. Se les inyectaron a los ratones NSG (n=6 por grupo) 10⁶ células con sh-p21 de MCF7 Tet-On p95HER2. Cuando los tumores alcanzaron ~200 mm³ (sombreado), se transfirieron PBMC humanas de un voluntario sano por inyección i.p. (10⁷ células/ratón). Los ratones se trataron con vehículo (control) o 1 mg/kg de TCB para p95HER2 (flechas). Se midieron los volúmenes de los tumores con un compás calibrador. Los gráficos muestran promedios; las barras de error corresponden a intervalos de confianza de un 95 %. Los valores de *p* se calcularon usando la prueba de la *t* de Student bilateral; **p*<0,05, ***p*<0,01.

La figura 17E muestra los niveles de CD45⁺ humana después de la inyección de PBMC. Se obtuvieron leucocitos de los ratones analizados en la figura 17D 15 días después de la inyección y se tiñeron con anti-huCD45 y se cuantificaron por citometría de flujo. Los diagramas de cajas muestran el porcentaje de células CD45⁺ en los ratones analizados en la figura 17D. Los bigotes más bajos y más altos indican los percentiles 10 y 90, respectivamente; los bordes inferiores y superiores de la caja indican los percentiles 25 y 75, respectivamente; la línea interna en la caja indica el percentil 50.

La figura 17F muestra el efecto de TCB para p95HER2 sobre el peso del tumor. Al final del experimento mostrado en la figura 17D, los tumores se extirparon y se pesaron. Los resultados se expresan como promedios; las barras de error corresponden a intervalos de confianza de un 95 %. Los valores de p se calcularon usando la prueba de la t de Student bilateral; * $p < 0,05$.

La figura 18 muestra el efecto de TCB para p95HER2 sobre el crecimiento de un xenoinjerto derivado del paciente (PDX).

La figura 18A muestra el análisis de la expresión de p95HER2 por inmunohistoquímica. Se tiñó una muestra del PDX indicado con anticuerpos anti-p95HER2 específicos como se describe previamente (ParraPalau *et al.*, Cancer Res 70, 8537-46 (2010)).

La figura 18B muestra el efecto de TCB para p95HER2 sobre el crecimiento del tumor. Se supervisaron ratones NSG (n=6 por grupo) que llevaban el PDX indicado hasta que los tumores alcanzaron ~300 mm³ (sombreado). A continuación, se transfirieron PBMC humanas de un voluntario sano por inyección i.p. (10⁷ células/ratón). Los ratones se trataron con vehículo (control) o 1 mg/kg de TCB para p95HER2 (flechas). Se midieron los volúmenes de los tumores con un compás calibrador. Los gráficos muestran promedios; las barras de error corresponden a intervalos de confianza de un 95 %. Los valores de p se calcularon usando la prueba de la t de Student bilateral; * $p < 0,05$.

La figura 18C muestra los niveles de CD45⁺ humana después de la inyección de PBMC. Se obtuvieron leucocitos de los ratones analizados en B 15 días después de la inyección y se tiñeron con anti-huCD45 y se cuantificaron por citometría de flujo. Los diagramas de cajas muestran el porcentaje de células CD45⁺ en los ratones analizados en la figura 18B. Los bigotes más bajos y más altos indican los percentiles 10 y 90, respectivamente; los bordes inferiores y superiores de la caja indican los percentiles 25 y 75, respectivamente; la línea interna en la caja indica el percentil 50.

La figura 18D muestra el efecto de TCB para p95HER2 sobre el peso del tumor. Al final del experimento mostrado en la figura 18B, los tumores se extirparon y se pesaron. Los resultados se expresan como promedios; las barras de error corresponden a intervalos de confianza de un 95 %. Los valores de p se calcularon usando la prueba de la t de Student bilateral; * $p < 0,05$.

La figura 18E muestra el efecto de TCB para p95HER2 en la infiltración de linfocitos T. Al final del experimento mostrado en la figura 18B, las muestras de tumor correspondientes al experimento mostrado en la figura 18B se desagregaron en células individuales, se tiñeron con anti-CD3, CD8 y CD4 humanas, y se cuantificó el número de células positivas por citometría de flujo. Los diagramas de cajas muestran el porcentaje de las células positivas para el marcador indicado. Los bigotes más bajos y más altos indican los percentiles 10 y 90, respectivamente; los bordes inferiores y superiores de la caja indican los percentiles 25 y 75, respectivamente; la línea interna en la caja indica el percentil 50. Los valores de p se calcularon usando la prueba de la t de Student bilateral; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

La figura 18F muestra el efecto de TCB para p95HER2 sobre células tumorales. Al final del experimento mostrado en la figura 18B, se tiñeron cortes sagitales de tumores con anticuerpos anti-citoqueratina humana y se cuantificó el porcentaje de células positivas. Los resultados se expresan como promedios; las barras de error corresponden a intervalos de confianza de un 95 %. Los valores de p se calcularon usando la prueba de la t de Student bilateral; *** $p < 0,001$. Las tinciones representativas se muestran en la figura 18G.

Estos datos permiten concluir que TCB para p95HER2 altera el crecimiento de un xenoinjerto derivado del paciente (figura 18B y D) sin incrementar los niveles de leucocitos circulantes (figura 18C). TCB para p95HER2 recluta eficazmente linfocitos T (tanto linfocitos T positivos para CD4 como para CD8 para tumores) (figura 18E).

Los niveles de citoqueratina (un marcador de las células tumorales mamarias en los tumores después del tratamiento) (figura 18F y 18G) muestran que la medida del volumen del tumor (figura 18B) o el peso del tumor (figura 18D) da lugar a la subestimación del efecto antitumoral de TCB para p95HER2 puesto que las lesiones restantes en TCB para p95HER2 están en gran parte desprovistas de células tumorales (figura 18F y G).

Ejemplo 7**Lisis de transfectantes de MCF10A y posterior activación de linfocitos T inducidas por TCB para p95HER2 en comparación con TCB para HER2**

5 Se evaluó la lisis de células diana y la posterior activación de linfocitos T mediada por TCB para p95HER2 usando transfectantes MCF10A_p95Her2, MCF10A_Her2, MCF10A_p95Her2-Her2 y MCF10A_vector así como células MCF7, esencialmente como se describe en los ejemplos previos. Se usaron PBMC humanas como efectoras y se detectó la lisis tumoral a las 46-48 h de incubación con TCB para p95HER2 o TCB para HER2. Se incubaron células MCF10A y MCF7 con concentraciones crecientes de TCB para HER2 (figura 19A) o TCB para p95HER2 (figura 19B) y con PBMC en una proporción de 10:1. Después de 48 h, se recogieron los sobrenadantes y se midió la lisis por liberación de LDH. Se obtuvieron PBMC del experimento con células MCF10A-vector, se tiñeron para detectar huCD45/CD8/CD4/CD69/CD25 y se analizaron por citometría de flujo (figura 19C).

Ejemplo 8**15 Unión de TCB para p95HER2 a células MCF10A que expresan HER2 o HER2 (M611A)**

A pesar de la clara preferencia de unión a células que expresan p95HER2, TCB para p95HER2 también se unió a células que expresan HER2 (figura 5B). Esta unión residual se podría deber a la interacción con el receptor de longitud completa o, de forma alternativa, a bajos niveles de expresión de p95HER2 en células que sobreexpresan HER2. Puesto que p95HER2 se sintetiza a partir del ARNm que codifica HER2 a través del inicio alternativo de la traducción del codón AUG que codifica la metionina 611 (Pedersen *et al.* (2009) *Mol Cell Biol* 29, 3319-3331), se analizó la unión de TCB para p95HER2 a células MCF10A que expresan una construcción de ADNc con una mutación de metionina a alanina en la posición 611 (M611A). Los resultados mostraron claramente que la unión de p95HER2-TCB a células que sobreexpresan HER2 se debe en gran parte a la generación de bajos niveles de p95HER2 sintetizados por el inicio alternativo de la traducción de metionina 611 (figura 20 A y B). Este resultado destaca la especificidad de TCB para p95HER2.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Moléculas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T biespecíficas

<130> P33883

<150> EP16191933.7

10 <151> 30/09/2016

<160> 33

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
 20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
 50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
 65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
 85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
 100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
 115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
 130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
 145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn

ES 2 897 217 T3

165

170

175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
 180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 195 200 205

<210> 2
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis
 <400> 2

5

Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr
 20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45

Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys
 50 55 60

Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu
 65 70 75 80

Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro
 85 90 95

Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn
 100 105 110

Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp
 115 120 125

Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
 130 135 140

Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
 145 150 155 160

Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
 165 170 175

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly

10

ES 2 897 217 T3

180

185

190

Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195

5 <210> 3
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CD3, VH

<400> 3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

15 <210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> CD3, HCDR1

<400> 4

25 Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 5
<211> 19
<212> PRT

ES 2 897 217 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD3, HCDR2

5 <400> 5

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

10 <210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CD3, HCDR3

<400> 6

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
20 1 5 10

<210> 7
<211> 109
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD3, VL

30 <400> 7

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> CD3, LCDR1
 <400> 8
 10
Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10
 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> CD3, LCDR2
 20
 <400> 9
Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5
 25
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> CD3, LCDR3
 <400> 10
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5
 35
 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> conector 1
 45
 <400> 11
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10
 50
 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> conector 2
 <400> 12
Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

ES 2 897 217 T3

<210> 13
 <211> 225
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 13

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

ES 2 897 217 T3

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro
 225

5 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> p95HER2, HCDR1
 <400> 14

Asp Phe Gly Met Ser
 1 5

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

20 <220>
 <223> p95HER2, HCDR2
 <400> 15

Thr Ile Asn Thr Asn Gly Gly Thr Thr His Tyr Pro Asp Asn Val Lys
 1 5 10 15

25 Gly

30 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> p95HER2, HCDR3
 35 <400> 16

Glu Gly Leu Asp Tyr
 1 5

40 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> p95HER2, LCDR1

<400> 17

5 **Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Ala Val Ala**
1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> p95HER2, LCDR2

15 <400> 18

Ser Ala Ser Asn Arg Phe Thr
1 5

<210> 19

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> p95HER2, LCDR3

<400> 19

Gln Gln Tyr Ser Thr Tyr Pro Leu Ala
1 5

30 <210> 20

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> p95HER2, VH

<400> 20

40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ile Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

ES 2 897 217 T3

Ala Thr Ile Asn Thr Asn Gly Gly Thr Thr His Tyr Pro Asp Asn Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Phe Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Pro Arg Glu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

5 <210> 21
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> p95HER2, VL

<400> 21

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Ile Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Leu Lys Ala Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Ala Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

15 <210> 22
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> p95HER2, VH-CH1(EE)-Fc (ojal, P329G LALA)

ES 2 897 217 T3

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ile Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Phe
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Asn Thr Asn Gly Gly Thr Thr His Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Phe Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Pro Arg Glu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu
 130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 195 200 205

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 210 215 220

ES 2 897 217 T3

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 23
<211> 667
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> p95HER2, VH-CH1(E E)-CD3, VL-CH1-Fc (botón, P329G LALA)

5

ES 2 897 217 T3

<400> 23

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ile Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Thr Asn Gly Gly Thr Thr His Tyr Pro Asp Asn Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Phe Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Pro Arg Glu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val
225 230 235 240

ES 2 897 217 T3

Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala
 245 250 255

Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln
 260 265 270

Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr
 275 280 285

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr
 290 295 300

Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu
 305 310 315 320

Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
 325 330 335

Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 340 345 350

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 370 375 380

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 405 410 415

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 420 425 430

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 435 440 445

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 450 455 460

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 485 490 495

ES 2 897 217 T3

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
500 505 510

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
515 520 525

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
530 535 540

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
545 550 555 560

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys
565 570 575

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
580 585 590

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
595 600 605

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
610 615 620

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
625 630 635 640

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
645 650 655

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
660 665

<210> 24
<211> 232
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> CD3, VH-CL

<400> 24

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

ES 2 897 217 T3

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
 115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 25
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> p95HER2, VL-CL(RK)

<400> 25

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

<400> 26

ES 2 897 217 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ile Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Asn Thr Asn Gly Gly Thr Thr His Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Phe Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Pro Arg Glu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 115 120 125
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 180 185 190
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 195 200 205
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

ES 2 897 217 T3

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Phe
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Asn Thr Asn Gly Gly Thr Thr His Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Phe Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Pro Arg Glu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 210 215 220

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 225 230 235 240

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 245 250 255

Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

ES 2 897 217 T3

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
515 520 525

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
530 535 540

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
545 550 555 560

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
565 570 575

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
580 585 590

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
595 600 605

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
610 615 620

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
625 630 635 640

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
645 650 655

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
660 665 670

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
675 680 685

<210> 28
<211> 214
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> CD3, VL—CH1

<400> 28

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

ES 2 897 217 T3

Val Ala Trp Tyr Gln Leu Lys Ala Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Ala Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 30
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys
 1 5 10 15

Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys
 20 25 30

5

10

ES 2 897 217 T3

Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val
 35 40 45
 Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu
 50 55 60
 Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu
 65 70 75 80
 Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met
 85 90 95
 Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys
 100 105 110
 Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile
 115 120 125
 Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val
 130 135 140
 Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu
 145 150 155 160
 Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu
 165 170 175
 Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro
 180 185 190
 Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly
 195 200 205
 Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser
 210 215 220
 Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
 225 230 235 240
 Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu
 245 250 255
 Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly
 260 265 270
 Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg

ES 2 897 217 T3

	275						280									285
Phe	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Trp	Glu	
	290					295					300					
Leu	Met	Thr	Phe	Gly	Ala	Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Glu	
305					310					315					320	
Ile	Pro	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Ile	
				325					330						335	
Cys	Thr	Ile	Asp	Val	Tyr	Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met	Ile	Asp	
			340					345					350			
Ser	Glu	Cys	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg	Glu	Leu	Val	Ser	Glu	Phe	Ser	Arg	
		355					360					365				
Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln	Arg	Phe	Val	Val	Ile	Gln	Asn	Glu	Asp	Leu	
	370					375					380					
Gly	Pro	Ala	Ser	Pro	Leu	Asp	Ser	Thr	Phe	Tyr	Arg	Ser	Leu	Leu	Glu	
385					390					395					400	
Asp	Asp	Asp	Met	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	Ala	Glu	Glu	Tyr	Leu	Val	Pro	
				405					410					415		
Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Cys	Pro	Asp	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Gly	Gly	Met	
			420					425					430			
Val	His	His	Arg	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	
		435					440					445				
Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	
	450					455					460					
Leu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Asp	Val	Phe	Asp	Gly	Asp	Leu	
465					470					475					480	
Gly	Met	Gly	Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Pro	Thr	His	Asp	Pro	
				485					490					495		
Ser	Pro	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr	Val	Pro	Leu	Pro	Ser	
			500					505					510			
Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr	Val	Ala	Pro	Leu	Thr	Cys	Ser	Pro	Gln	Pro	Glu	
		515					520					525				

ES 2 897 217 T3

Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu
530 535 540

Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro
545 550 555 560

Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala
565 570 575

Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly
580 585 590

Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
595 600 605

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro Pro
610 615 620

Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly
625 630 635 640

Leu Asp Val Pro Val
645

<210> 31
<211> 448
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> HER2, VH-CH1(EE)-Fc (ojal, P329G LALA)

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 897 217 T3

				85						90						95
Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
			100					105					110			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
		115						120				125				
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
	130					135					140					
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
145					150					155					160	
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
				165					170					175		
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
			180					185					190			
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
		195					200					205				
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
	210					215					220					
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
			245						250					255		
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
			260					265					270			
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
		275					280					285				
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
	290					295					300					
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
305					310					315					320	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	
				325					330					335		

ES 2 897 217 T3

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 32
<211> 673
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HER2, VH-CH1(EE)-CD3, VL-CH1-Fc (botón, P329G LALA)

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

5

10

ES 2 897 217 T3

			100						105							110
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
		115						120				125				
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
	130					135					140					
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
145					150					155					160	
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
				165					170					175		
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
			180					185					190			
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
		195					200					205				
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
	210					215					220					
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	
225					230					235					240	
Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	
				245					250						255	
Gly	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	
			260					265					270			
Gln	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	
		275					280					285				
Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	
	290					295					300					
Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	
305					310					315					320	
Glu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	
				325					330					335		
Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
			340					345					350			

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 355 360 365

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 370 375 380

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 385 390 395 400

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 405 410 415

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 420 425 430

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 435 440 445

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 450 455 460

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 465 470 475 480

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 485 490 495

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 500 505 510

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 515 520 525

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 530 535 540

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 545 550 555 560

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 565 570 575

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 580 585 590

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 595 600 605

ES 2 897 217 T3

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
610 615 620

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
625 630 635 640

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
645 650 655

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
660 665 670

Pro

<210> 33
<211> 214
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> HER2, VL-CL(RK)

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly
115 120 125

ES 2 897 217 T3

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

5 (a) un primer resto de unión a antígeno que se une específicamente a p95HER2;

(b) un segundo resto de unión a antígeno que se une específicamente a CD3;

10 en la que el primer resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada, en particular una región variable de la cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 14, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 15 y la HCDR 3 de SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera, en particular una región variable de la cadena ligera humanizada, que comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 17, la LCDR 2 de SEQ ID NO: 18 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 19.

15 2. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el primer resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

20 3. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el primer y/o el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab.

25 4. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab entrecruzada en la 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 reemplazan entre sí y/o en la que el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional.

30 5. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el segundo resto de unión a antígeno comprende la HCDR 1 de SEQ ID NO: 4, la HCDR 2 de SEQ ID NO: 5, la HCDR 3 de SEQ ID NO: 6, la LCDR 1 de SEQ ID NO: 8, la LCDR 2 de SEQ ID NO: 9 y la LCDR 3 de SEQ ID NO: 10.

35 6. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el segundo resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

40 7. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el primer resto de unión a antígeno es una primera molécula Fab que se une específicamente a p95HER2, el segundo resto de unión a antígeno es una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3, en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

45 y

50 i) en el dominio constante CL de la primera molécula Fab, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab, 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 de acuerdo con el índice EU de Kabat); o

55 ii) en el dominio constante CL de la segunda molécula Fab, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 del segunda molécula Fab, 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 de acuerdo con el índice EU de Kabat).

60 8. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 7, en la que

65 (i) en el dominio constante CL de la primera molécula Fab, el aminoácido en la posición 124 se sustituye

independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab, 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 de acuerdo con el índice EU de Kabat);

5

(ii) en el dominio constante CL de la primera molécula Fab, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat);

10

(iii) en el dominio constante CL de la primera molécula Fab, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat);

15

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

20

25

(v) en el dominio constante CL de la primera molécula Fab, el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab, el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

30

9. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además

35

c) un tercer resto de unión a antígeno que se une específicamente a p95HER2.

10. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab, en particular una molécula Fab convencional.

40

11. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en la que el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al primer resto de unión a antígeno.

45

12. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende adicionalmente

d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable.

50

13. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que

(i) el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan entre sí, opcionalmente por medio de un conector peptídico;

55

(ii) el primer y el segundo restos de unión a antígeno son moléculas Fab y el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno; o

60

(iii) el primer y el segundo restos de unión a antígeno son moléculas Fab y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno.

65

14. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 12, en la que

- 5 (i) el primer y el segundo restos de unión a antígeno son moléculas Fab y el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc, y opcionalmente el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab y se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o segunda subunidad del dominio Fc;
- 10 (ii) el primer y el segundo restos de unión a antígeno son moléculas Fab y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc, y opcionalmente el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab y se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o segunda subunidad del dominio Fc;
- 15 (iii) el primer y el segundo restos de unión a antígeno son moléculas Fab y el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc;
- 20 (iv) el primer, segundo y tercer restos de unión a antígeno son moléculas Fab y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno; o
- 25 (v) el primer, segundo y tercer restos de unión a antígeno son moléculas Fab y el primer y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno.
- 30 15. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en la que el dominio Fc es un dominio Fc de IgG, específicamente una IgG₁ o IgG₄, y/o en la que el dominio Fc es un dominio Fc humano.
- 35 16. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en la que el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc; en la que en particular
- 40 en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc un residuo aminoacídico se reemplaza por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando de este modo una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que se puede situar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc un residuo aminoacídico se reemplaza por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la que se puede situar la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad; y en la que opcionalmente
- 45 (i) dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande se selecciona del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), y dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V);
- 50 (ii) en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza por un residuo de triptófano (T366W), y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, el residuo de tirosina en la posición 407 se reemplaza por un residuo de valina (Y407V) y, opcionalmente, en la segunda subunidad del dominio Fc, adicionalmente, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza por un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se reemplaza por un residuo de alanina (L368A) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat);
- 55 (iii) en la primera subunidad del dominio Fc, adicionalmente, el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza por un residuo de cisteína (S354C) o el residuo de ácido glutámico en la posición 356 se reemplaza por un residuo de cisteína (E356C), y en la segunda subunidad del dominio Fc, adicionalmente, el residuo de tirosina en la posición 349 se reemplaza por un residuo de cisteína (Y349C) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat); y/o
- 60 (iv) la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas S354C y T366W, y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 65 17. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-16, en la que
- (i) el dominio Fc presenta afinidad de unión reducida a un receptor Fc, en particular un receptor Fcγ, y/o función efectora reducida, en particular citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), en comparación con un

dominio Fc de IgG₁ natural;

(ii) el dominio Fc comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor Fc y/o la función efectora, opcionalmente en la que dicha una o más sustituciones aminoacídicas están en una o más posiciones seleccionadas del grupo de L234, L235 y P329 (numeración del índice EU de Kabat); y/o

(iii) cada subunidad del dominio Fc comprende tres sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor Fc activador y/o función efectora en la que dichas sustituciones aminoacídicas son L234A, L235A y P329G (numeración del índice EU de Kabat).

18. Uno o más polinucleótidos aislados que codifican la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.

19. Uno o más vectores, en particular un vector de expresión, que comprenden el/los polinucleótido(s) de la reivindicación 18.

20. Una célula huésped que comprende el/los polinucleótido(s) de la reivindicación 18 o el/los vector(es) de la reivindicación 19.

21. Un procedimiento de producción de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que se puede unir específicamente a p95HER2 y CD3, que comprende las etapas de a) cultivar la célula huésped de la reivindicación 20 en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y b) opcionalmente recuperar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T.

22. Una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T producida por el procedimiento de la reivindicación 21.

23. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o 22 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

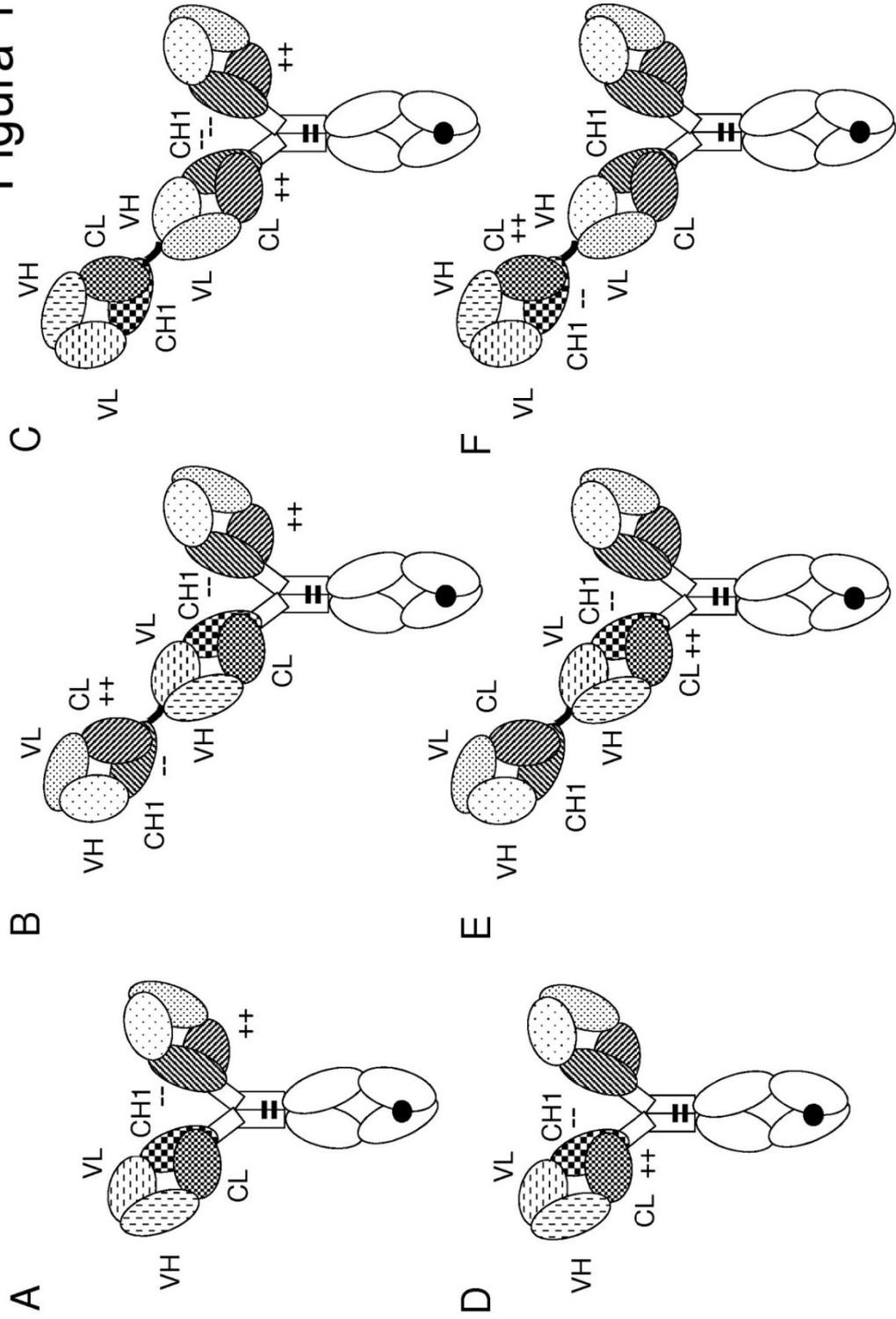
24. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o 22 o la composición farmacéutica de la reivindicación 23 para su uso

(i) como medicamento;

(ii) en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesita el mismo; o

(iii) en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesita el mismo, en el que la enfermedad es cáncer.

Figura 1



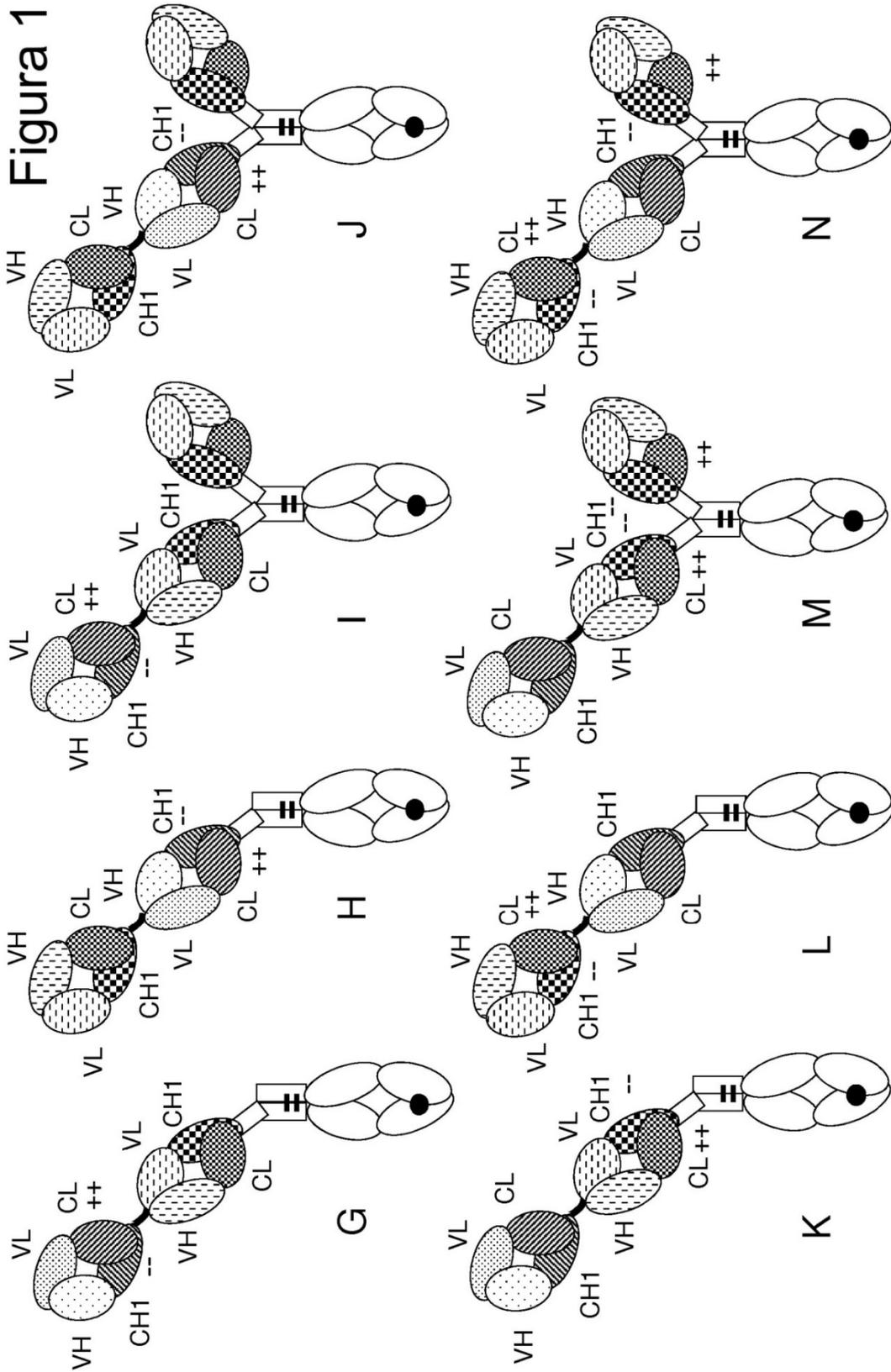


Figura 1

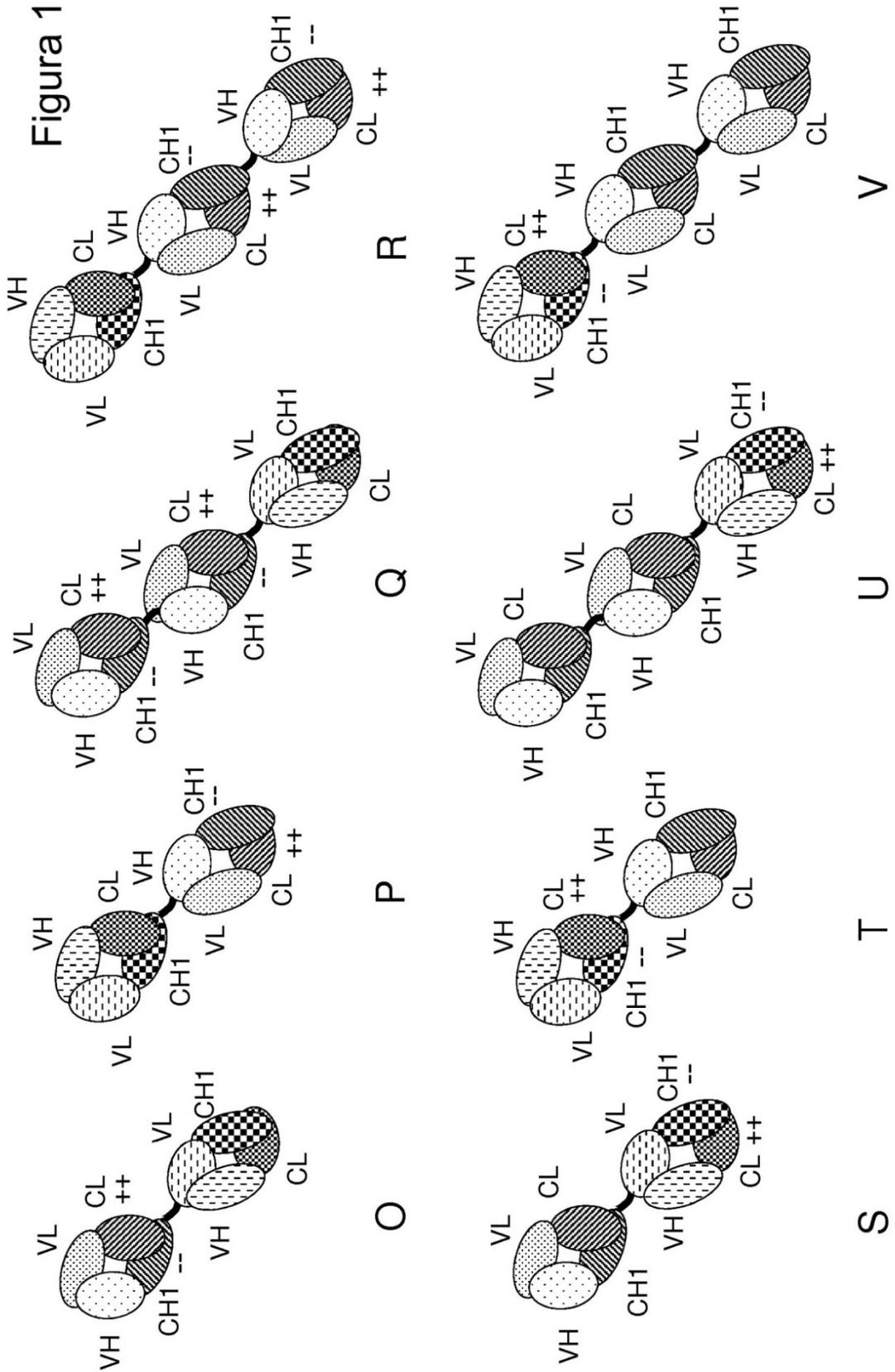
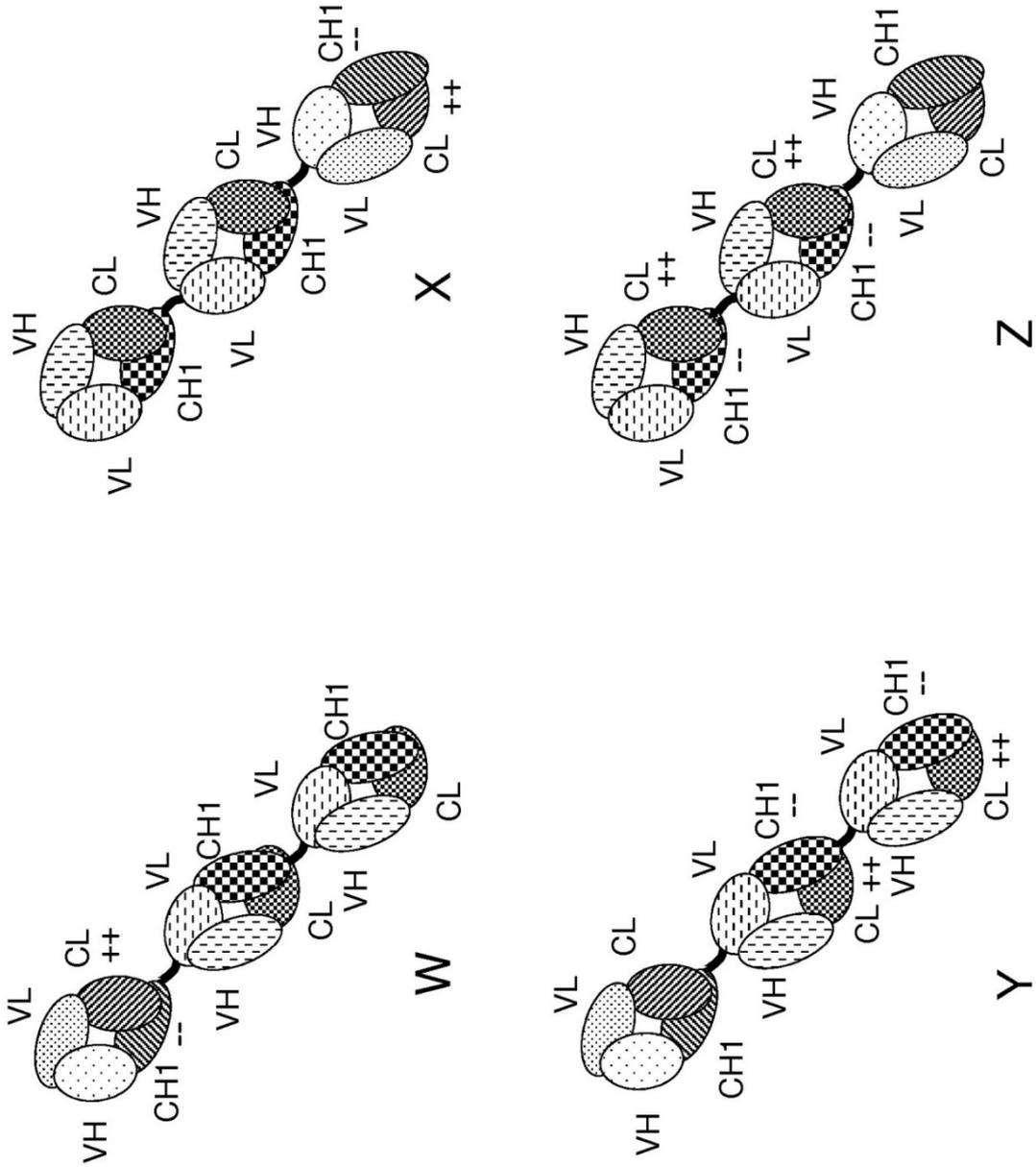


Figura 1



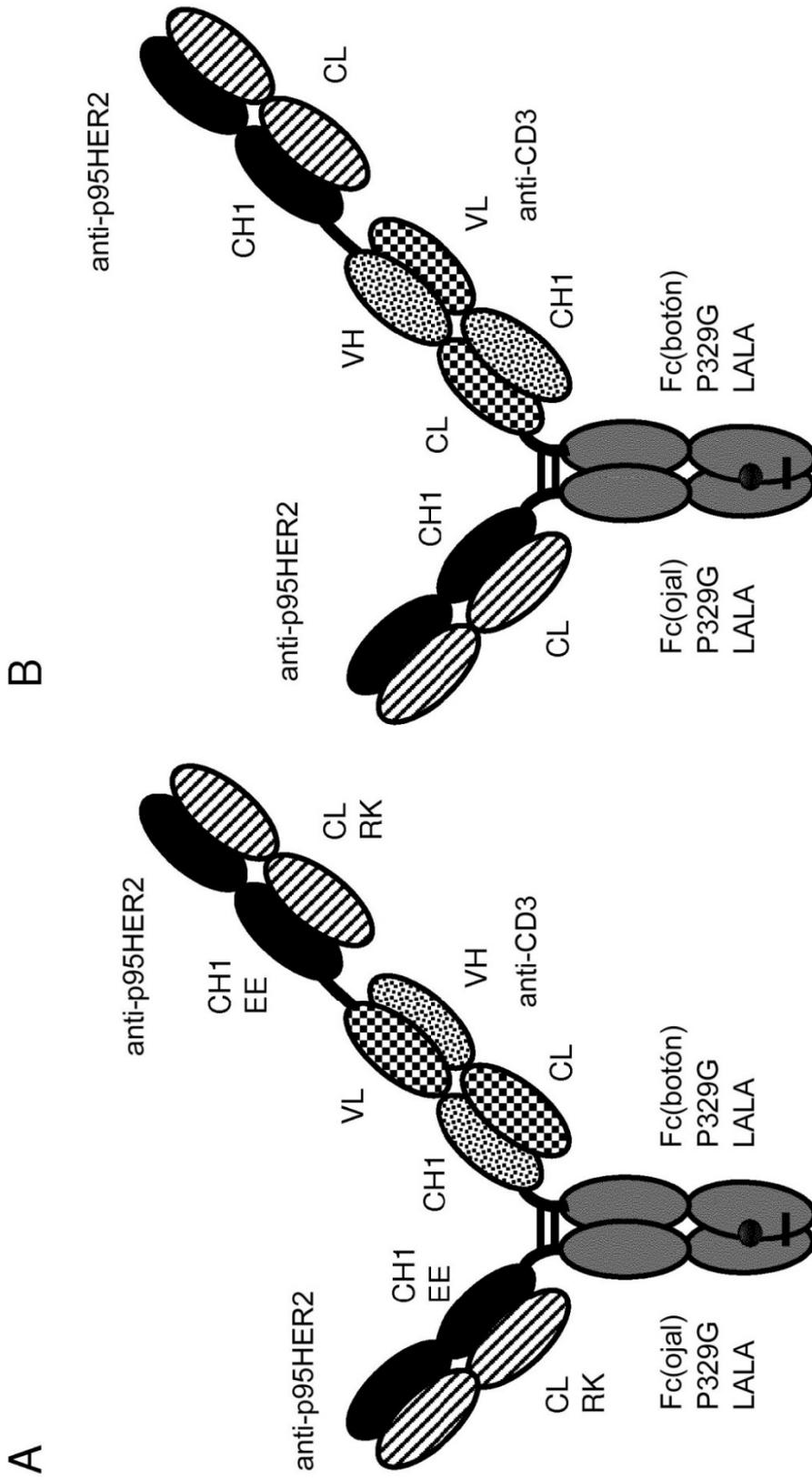


Figura 2

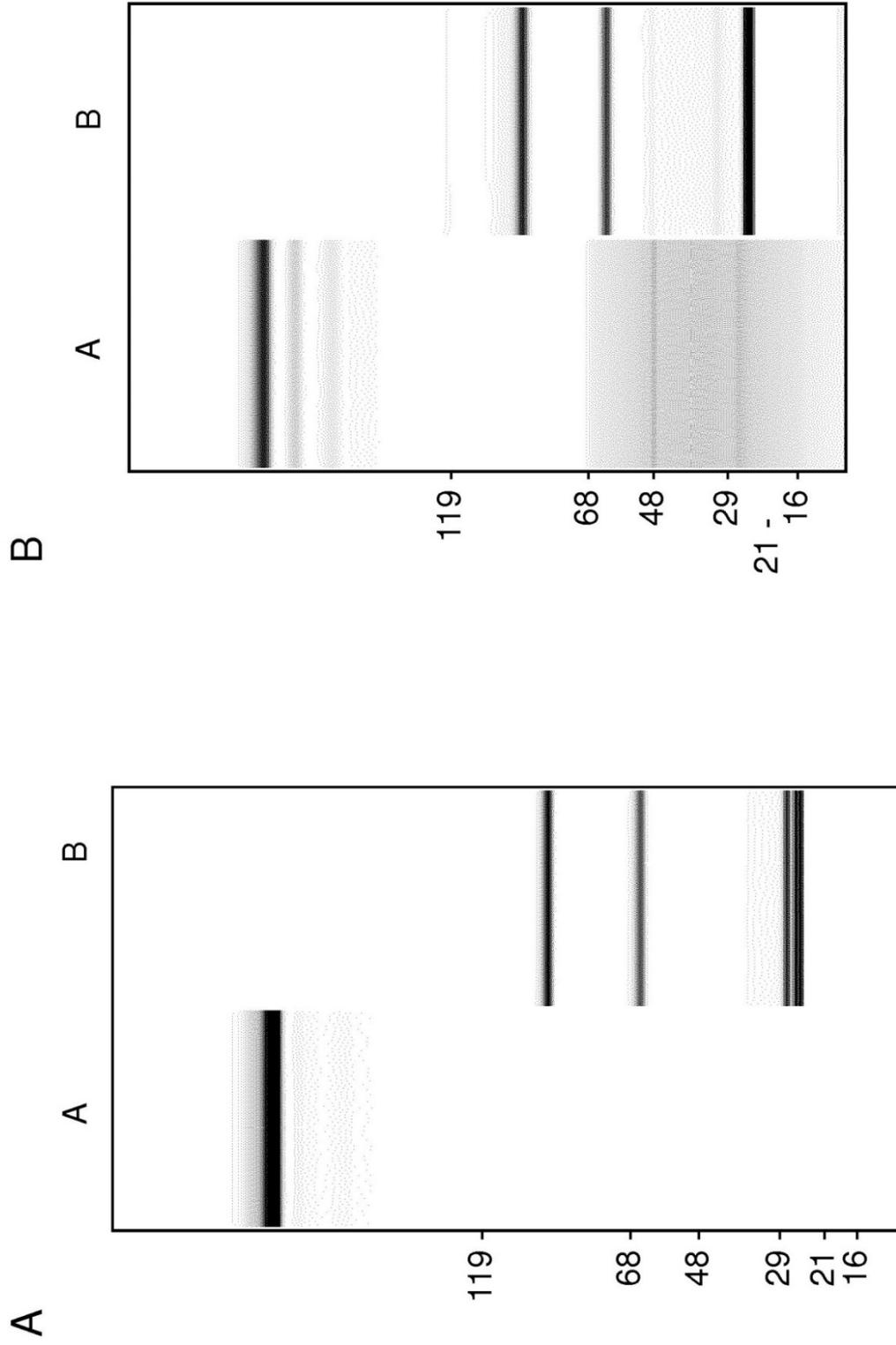


Figura 3

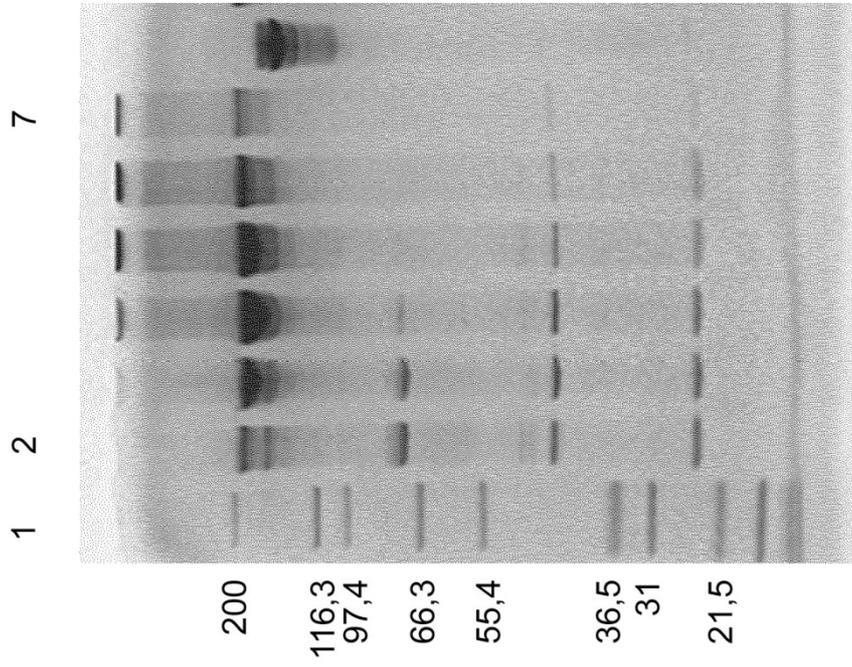


Figura 4

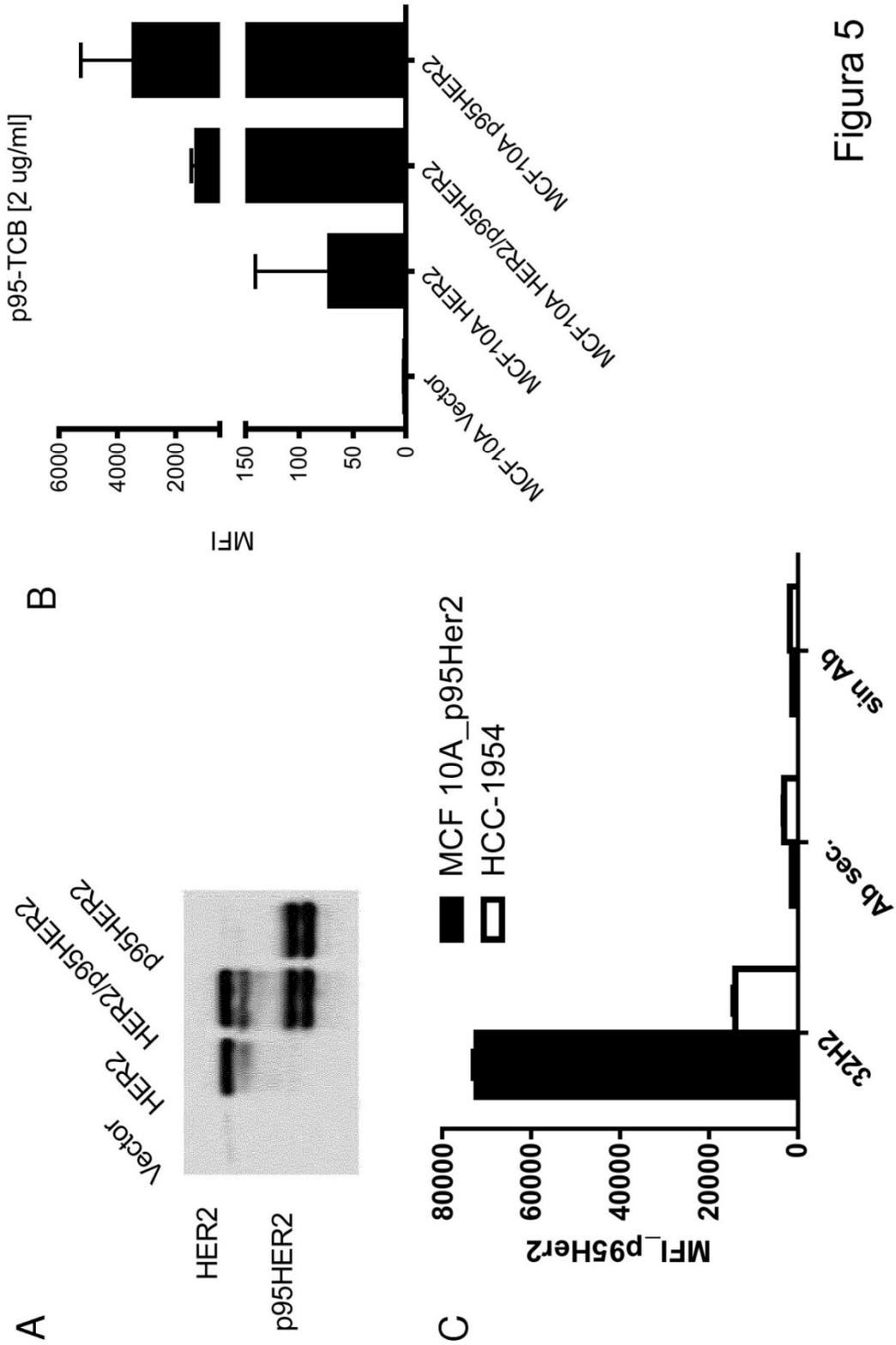


Figura 5

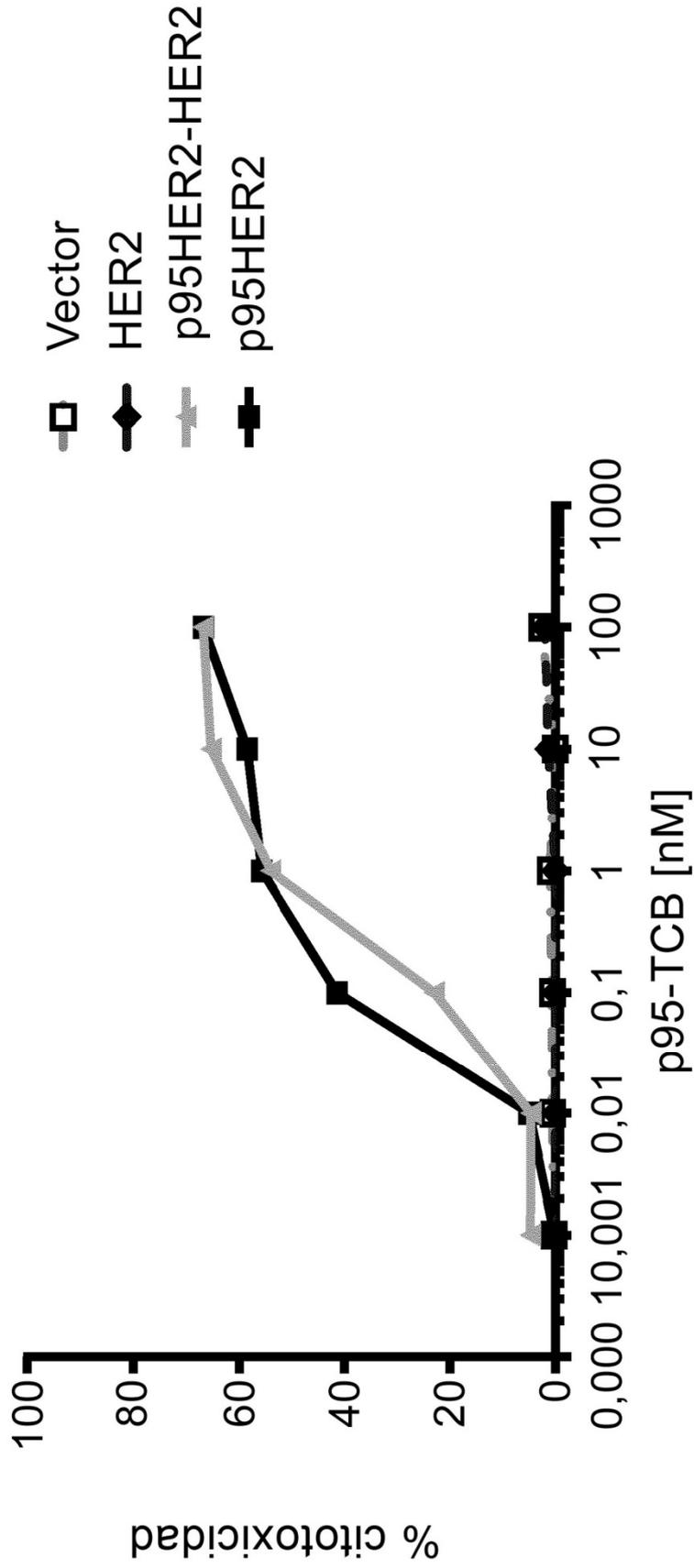


Figura 6

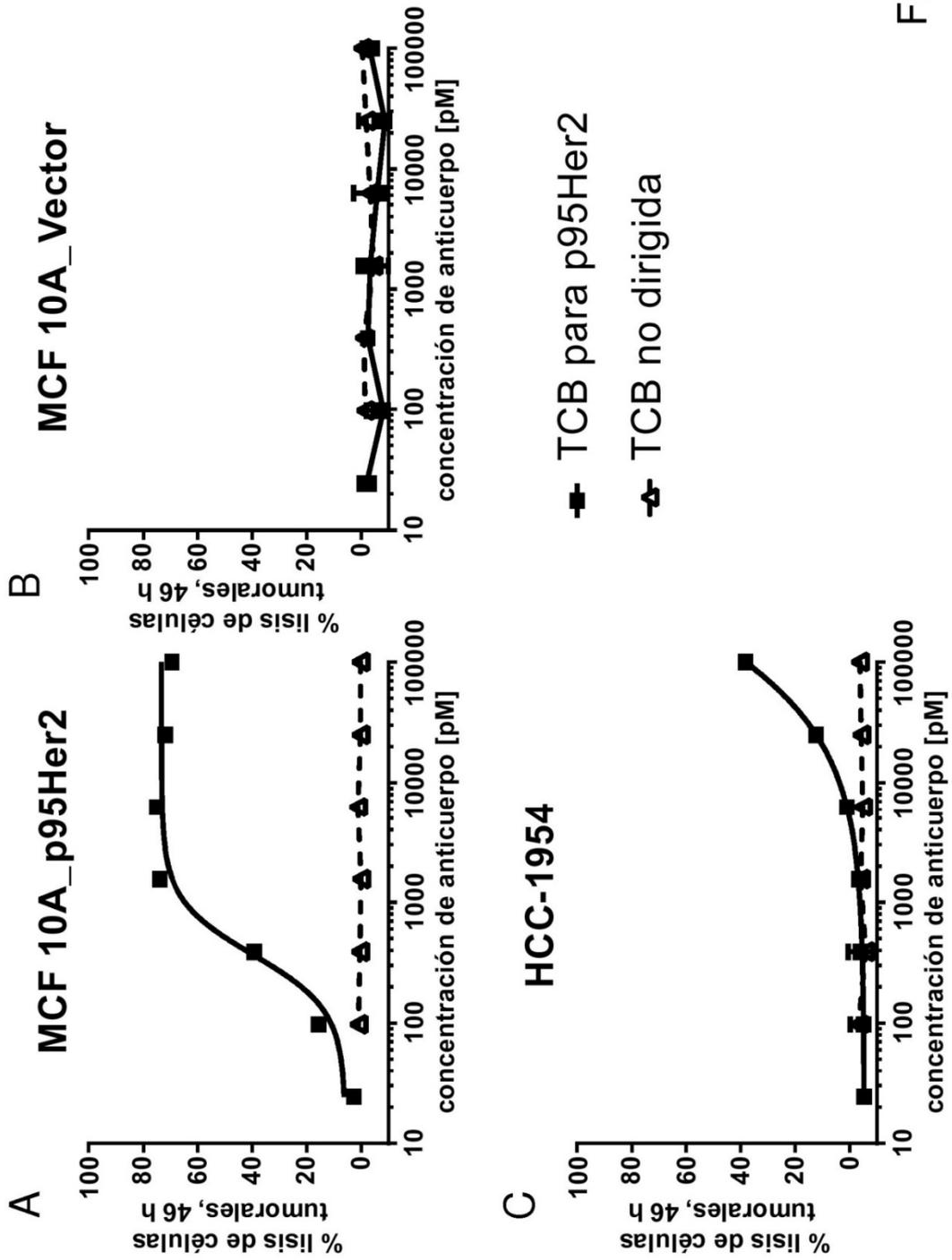


Figura 7

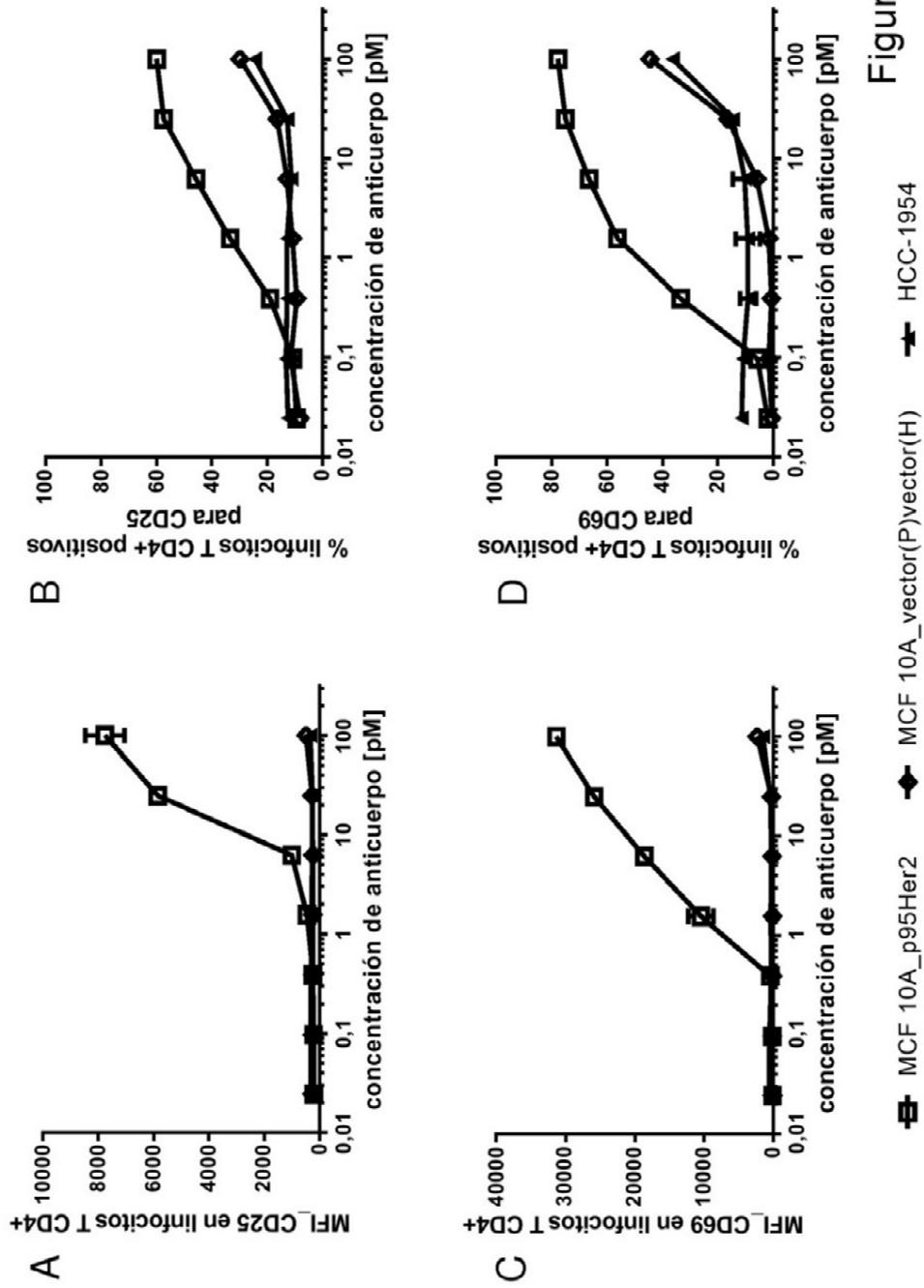


Figura 8

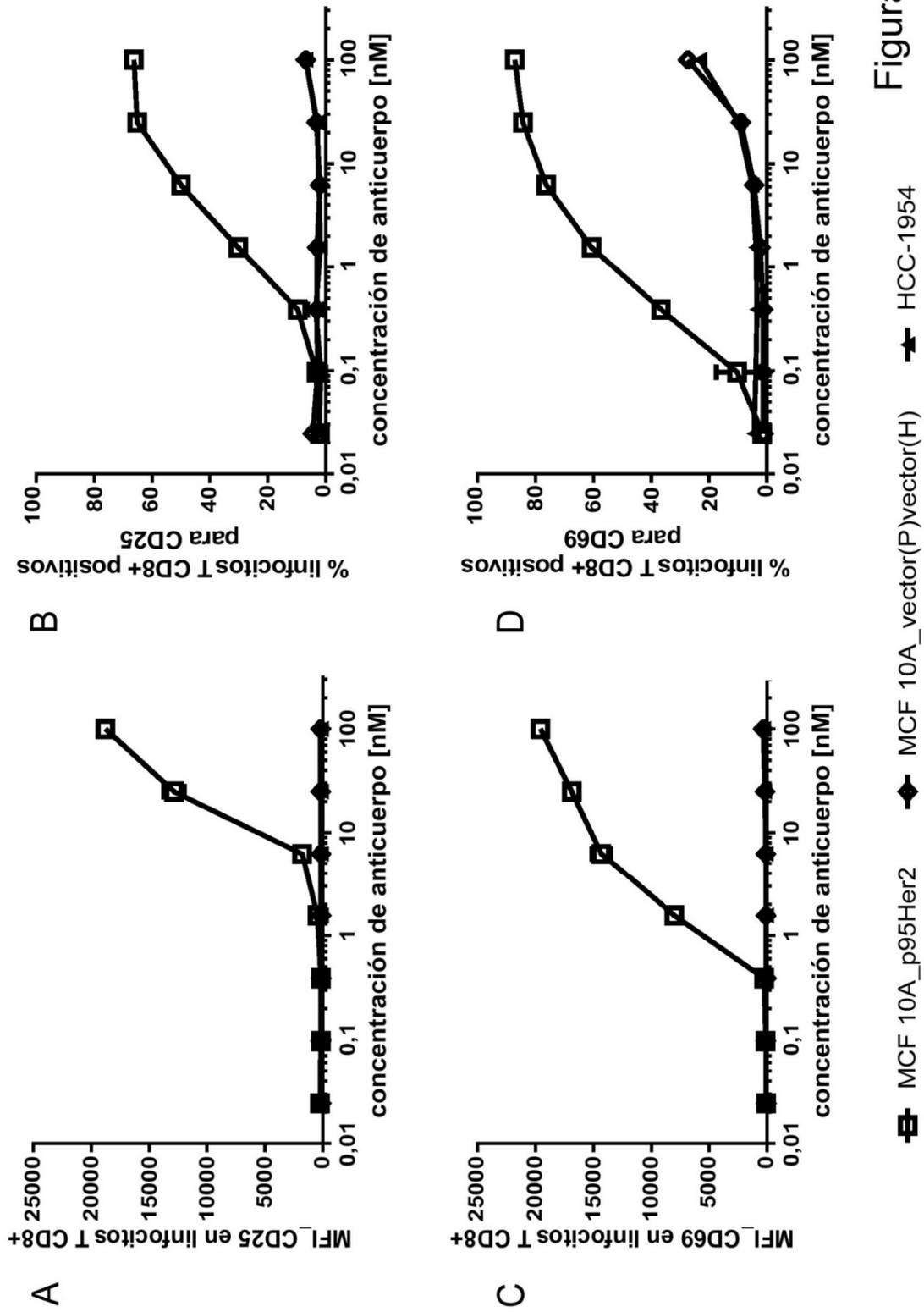


Figura 9

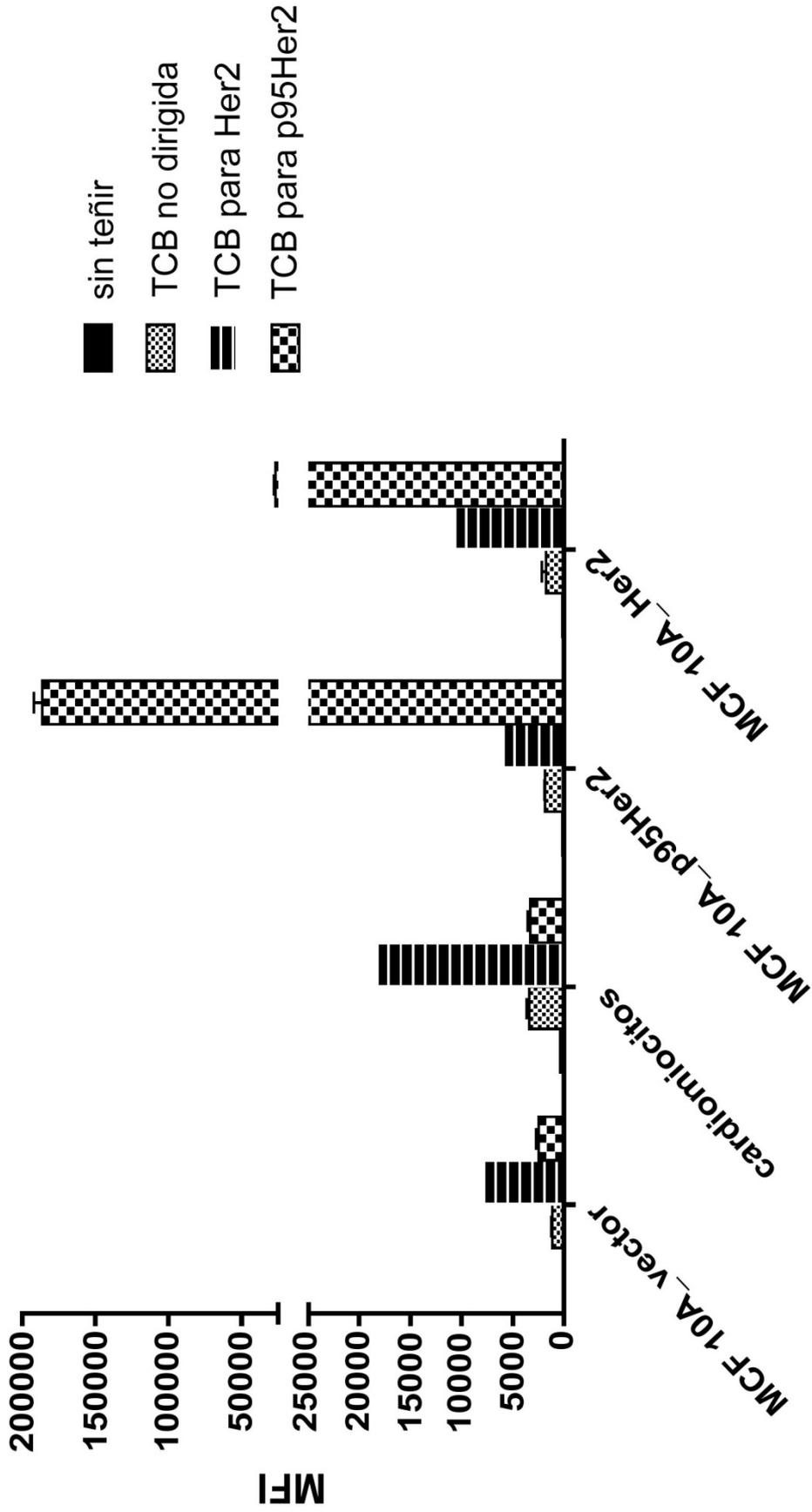


Figura 10

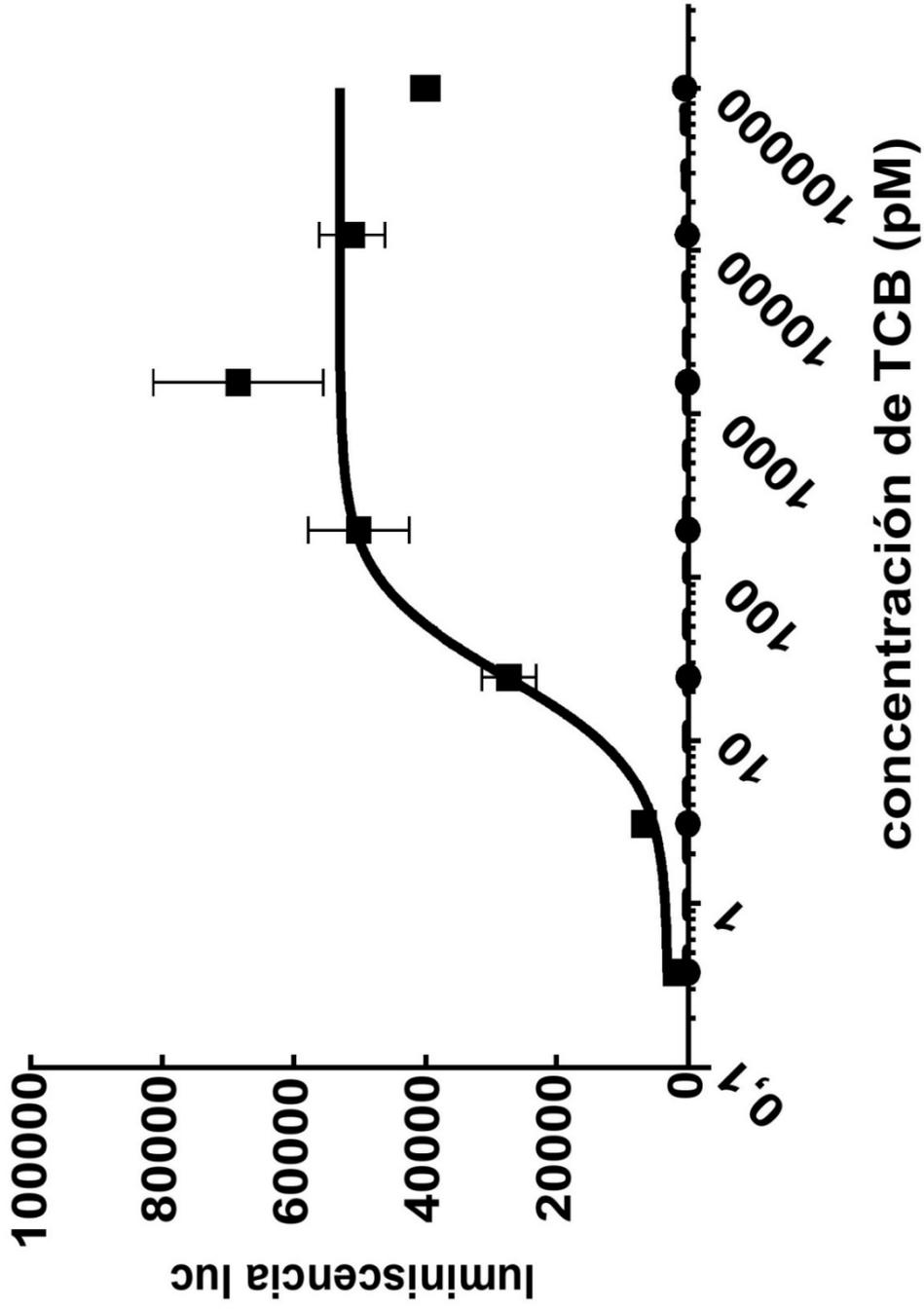
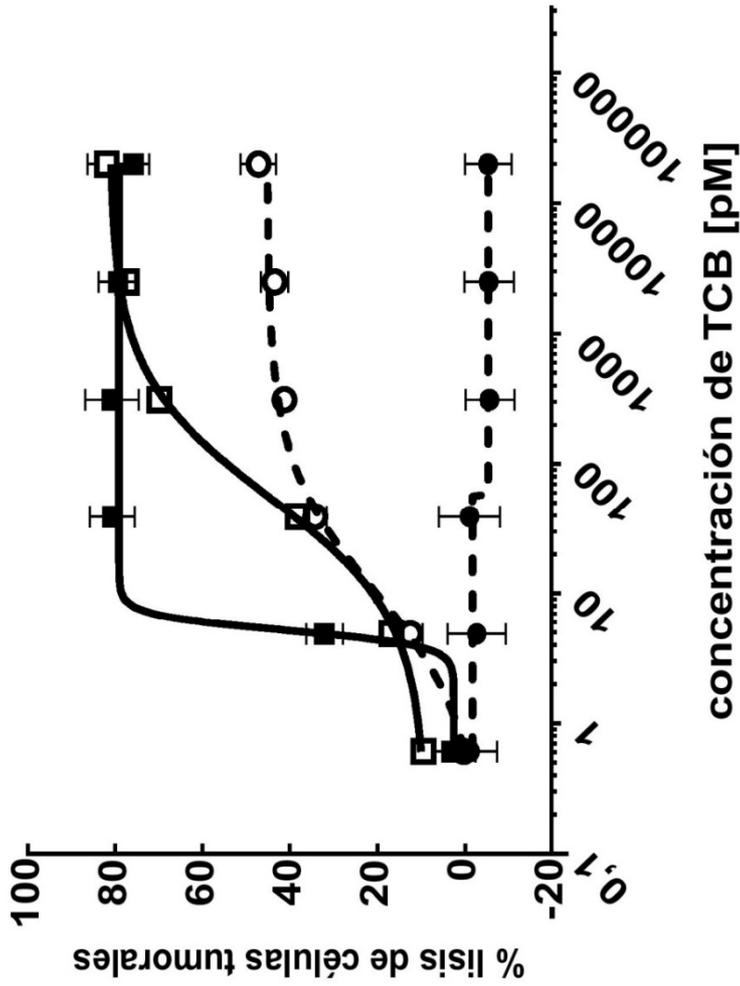


Figura 11



- TCB para p95Her2_cardiomiocitos
- TCB para Her2_cardiomiocitos
- TCB para p95Her2_MCF 10A-p95Her2
- TCB para Her2_MCF 10A-Her2

Figura 12

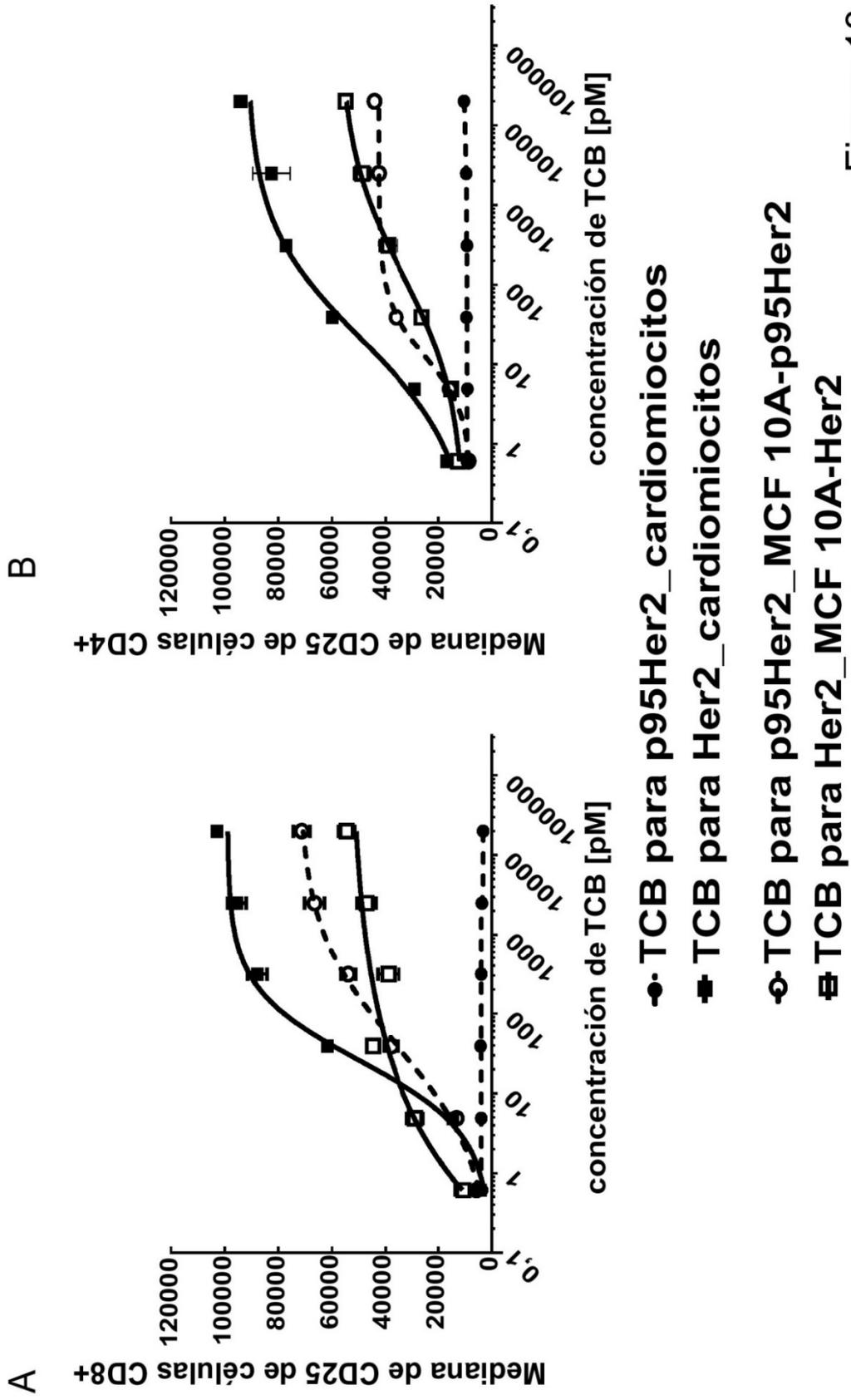


Figura 13

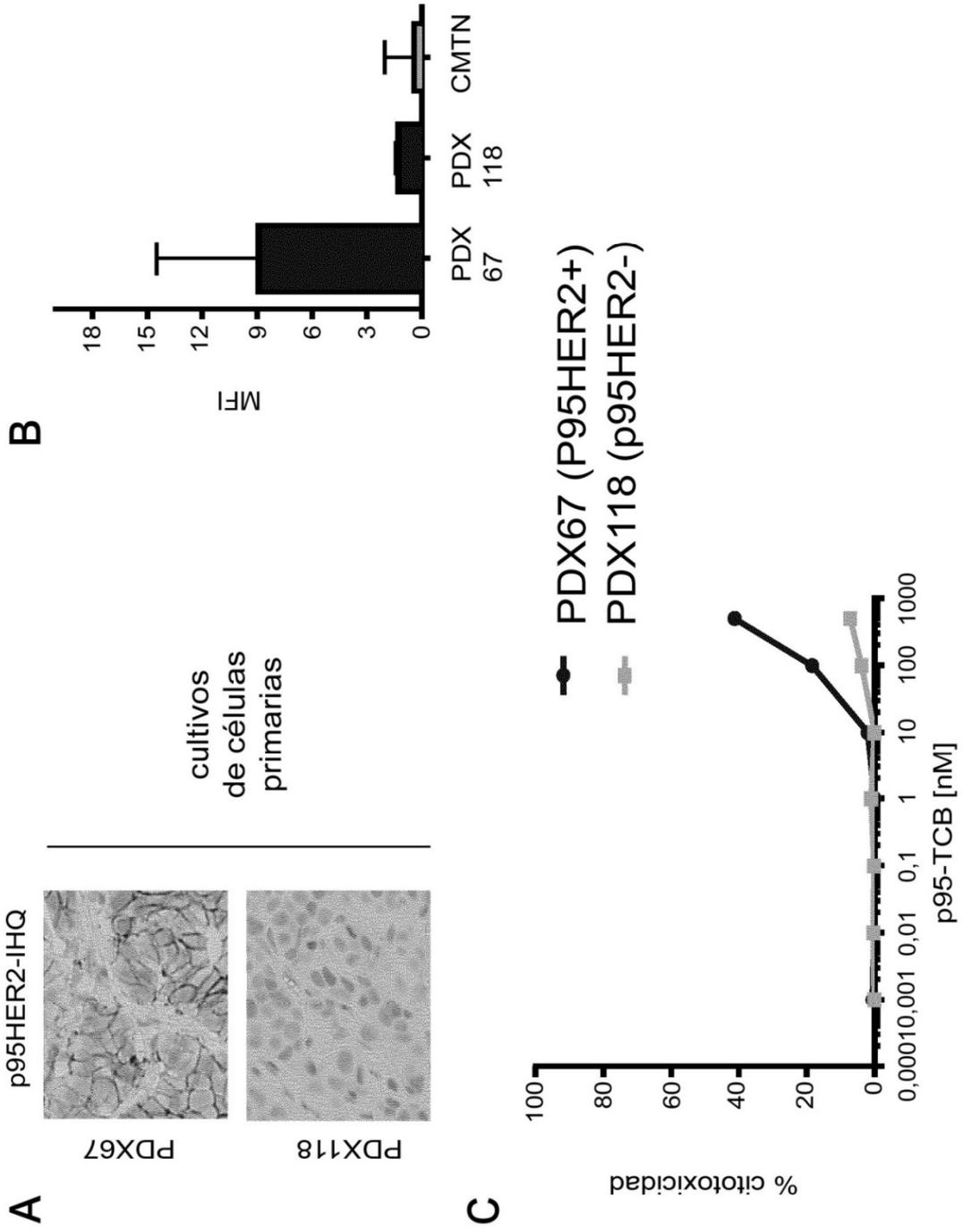


Figura 14

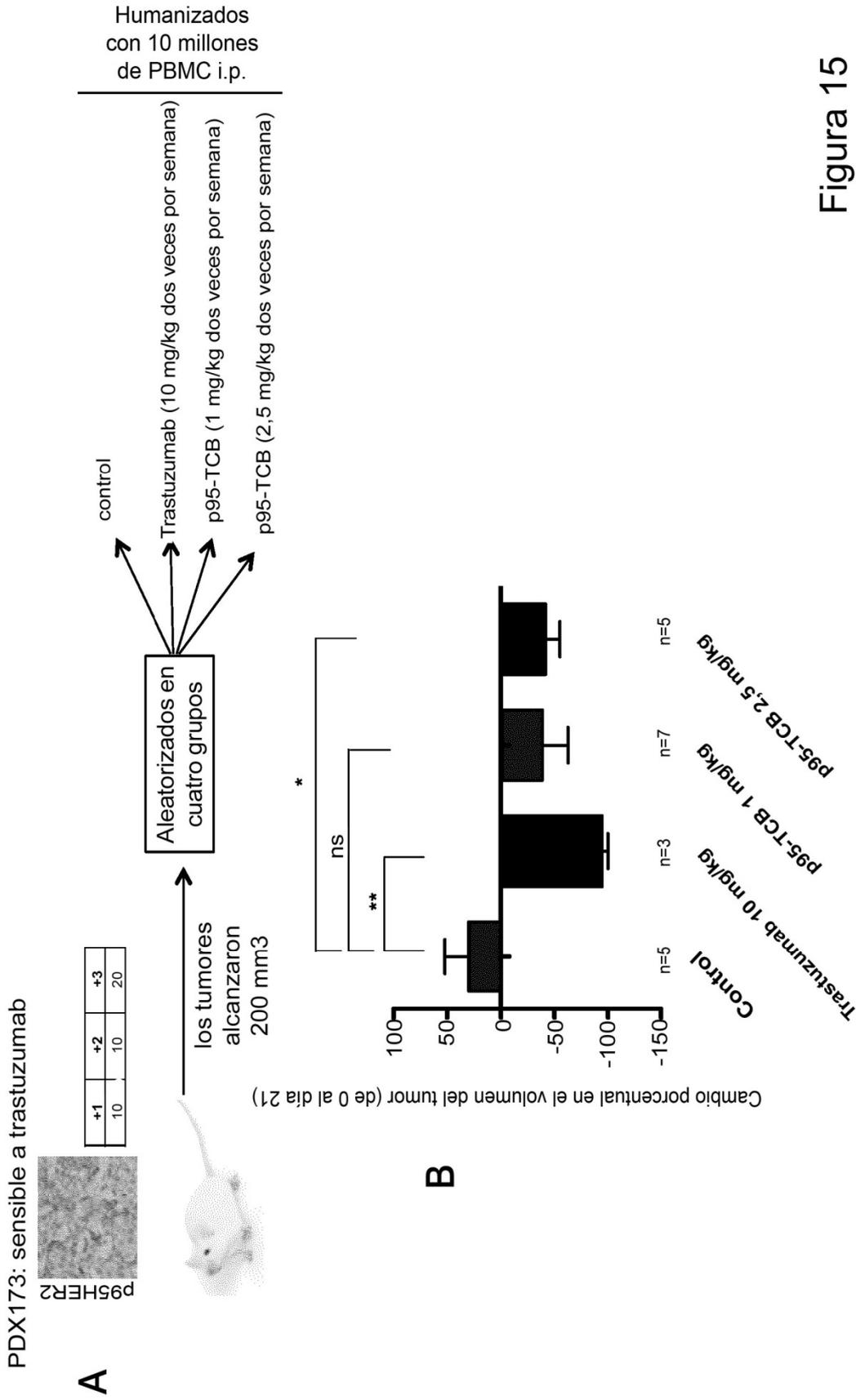


Figura 15

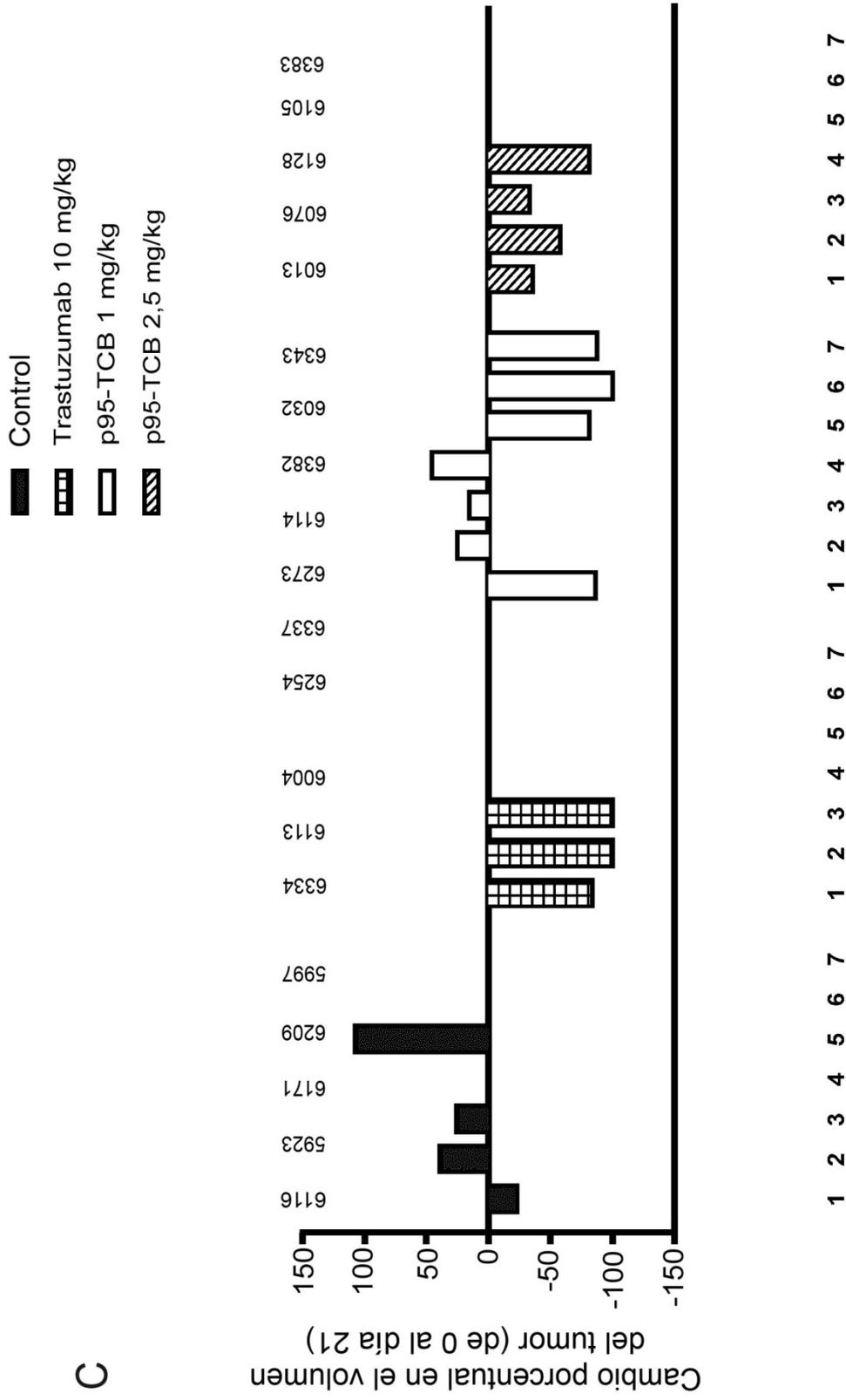


Figura 15

D

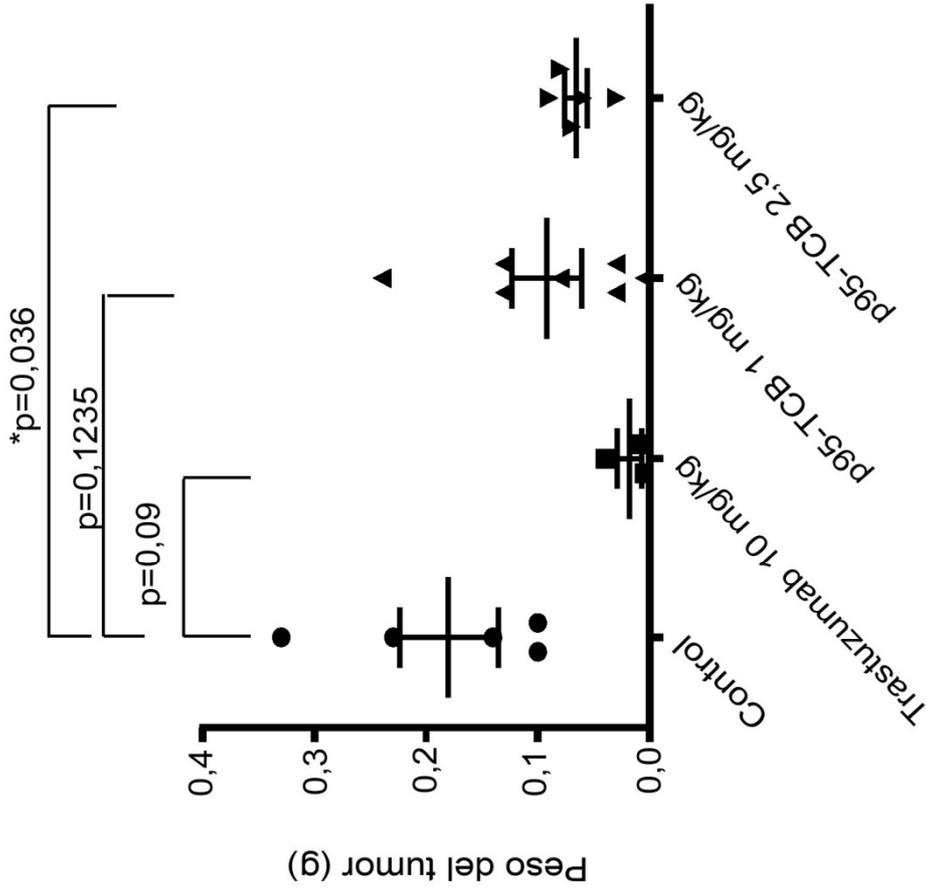


Figura 15

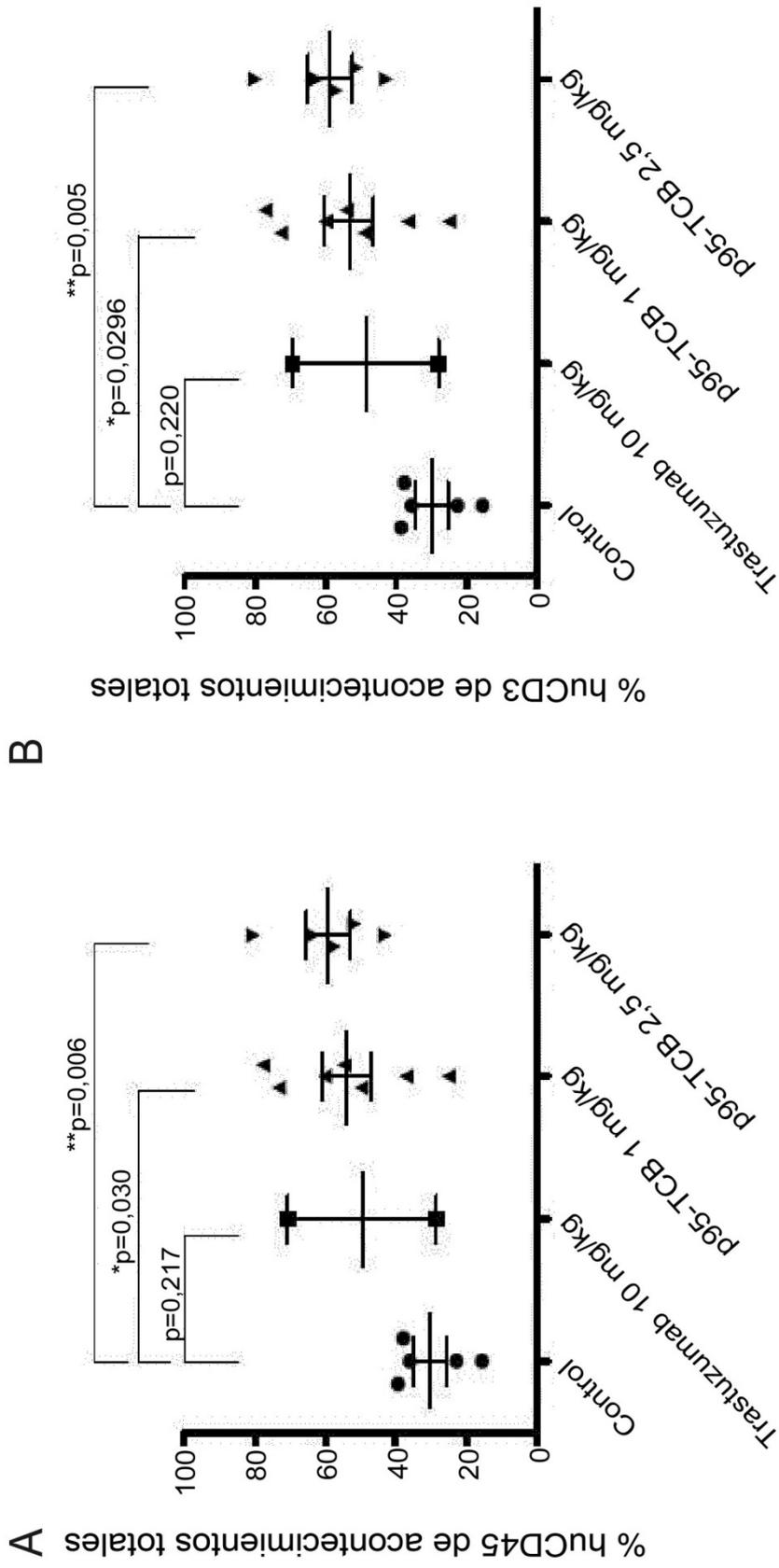


Figura 16

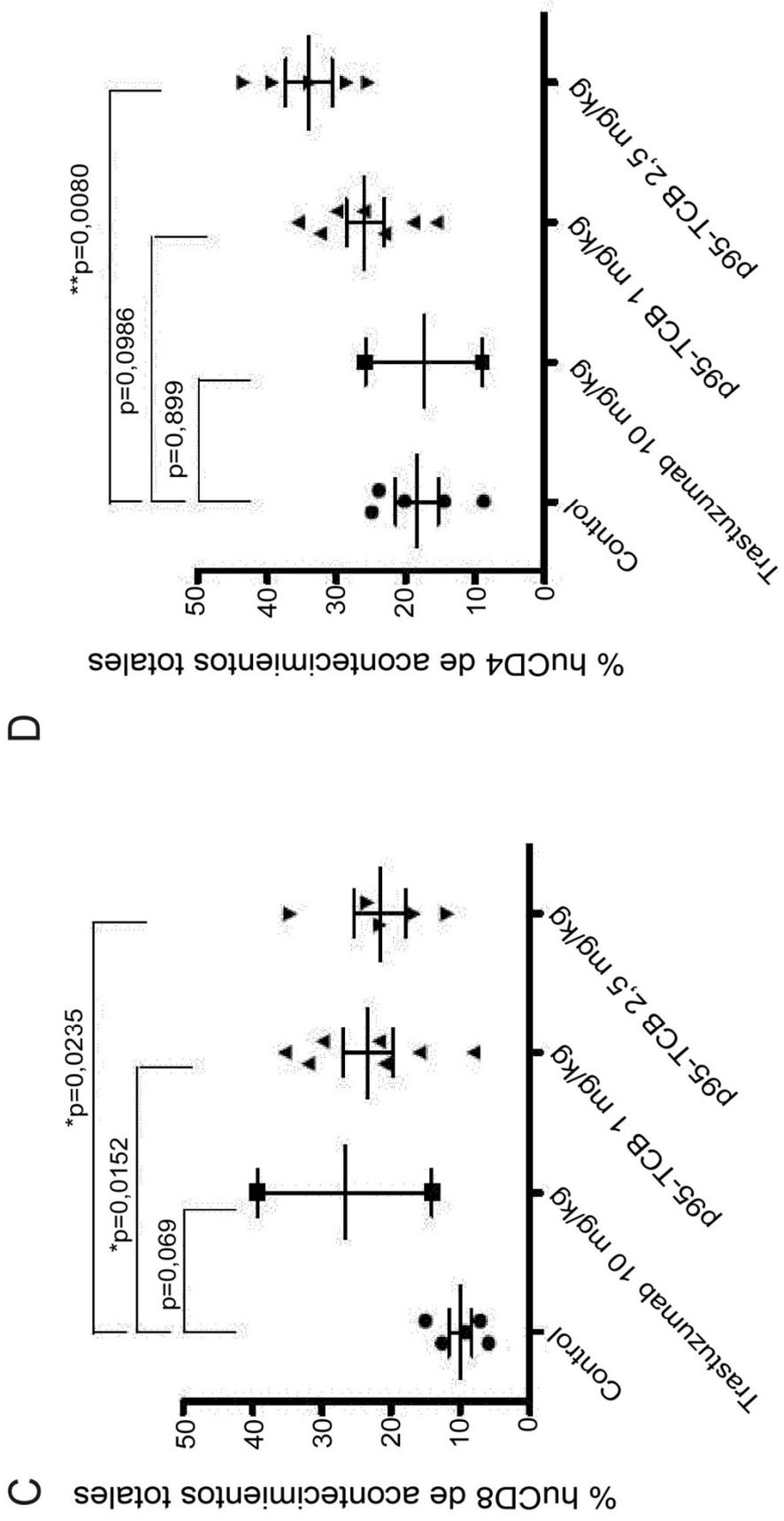


Figura 16

E

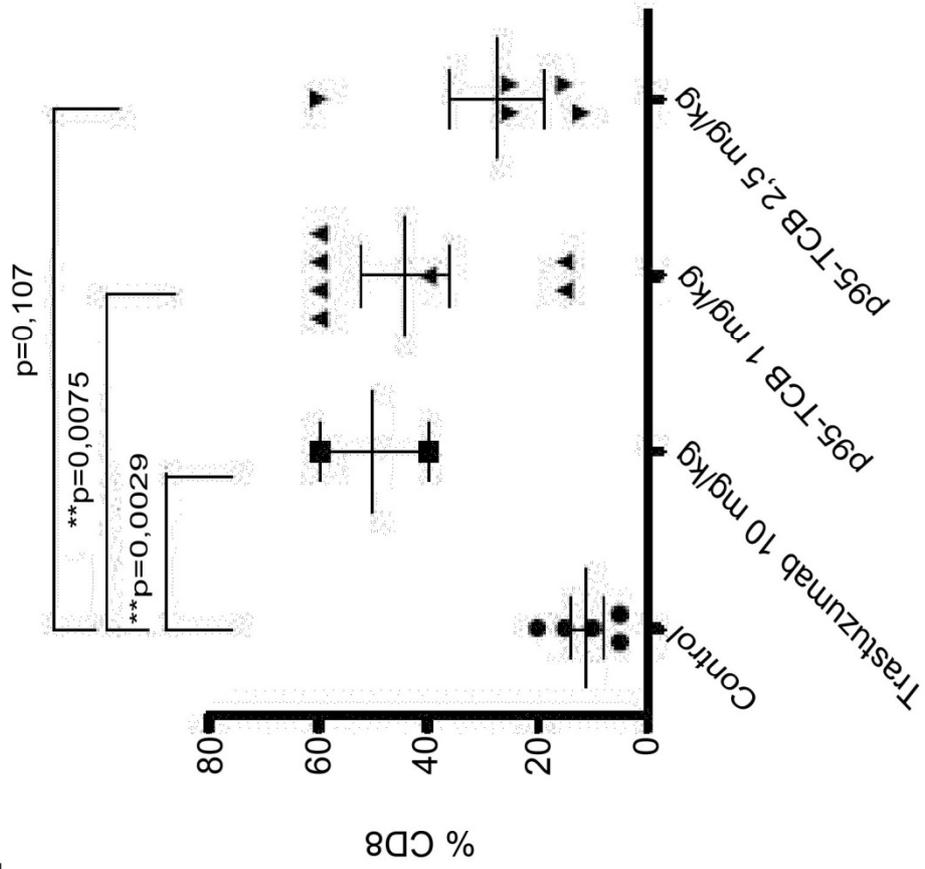


Figura 16

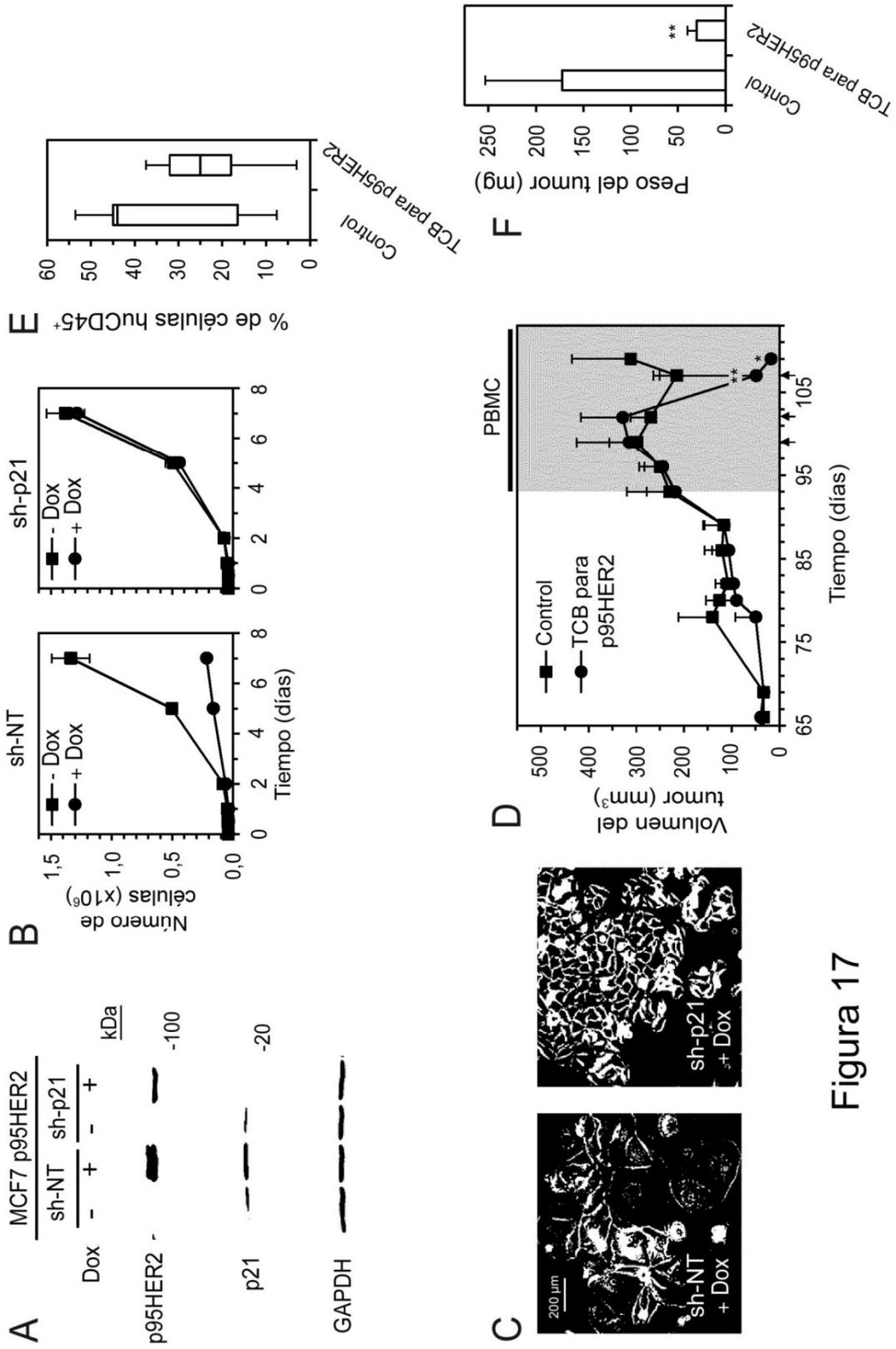


Figura 17

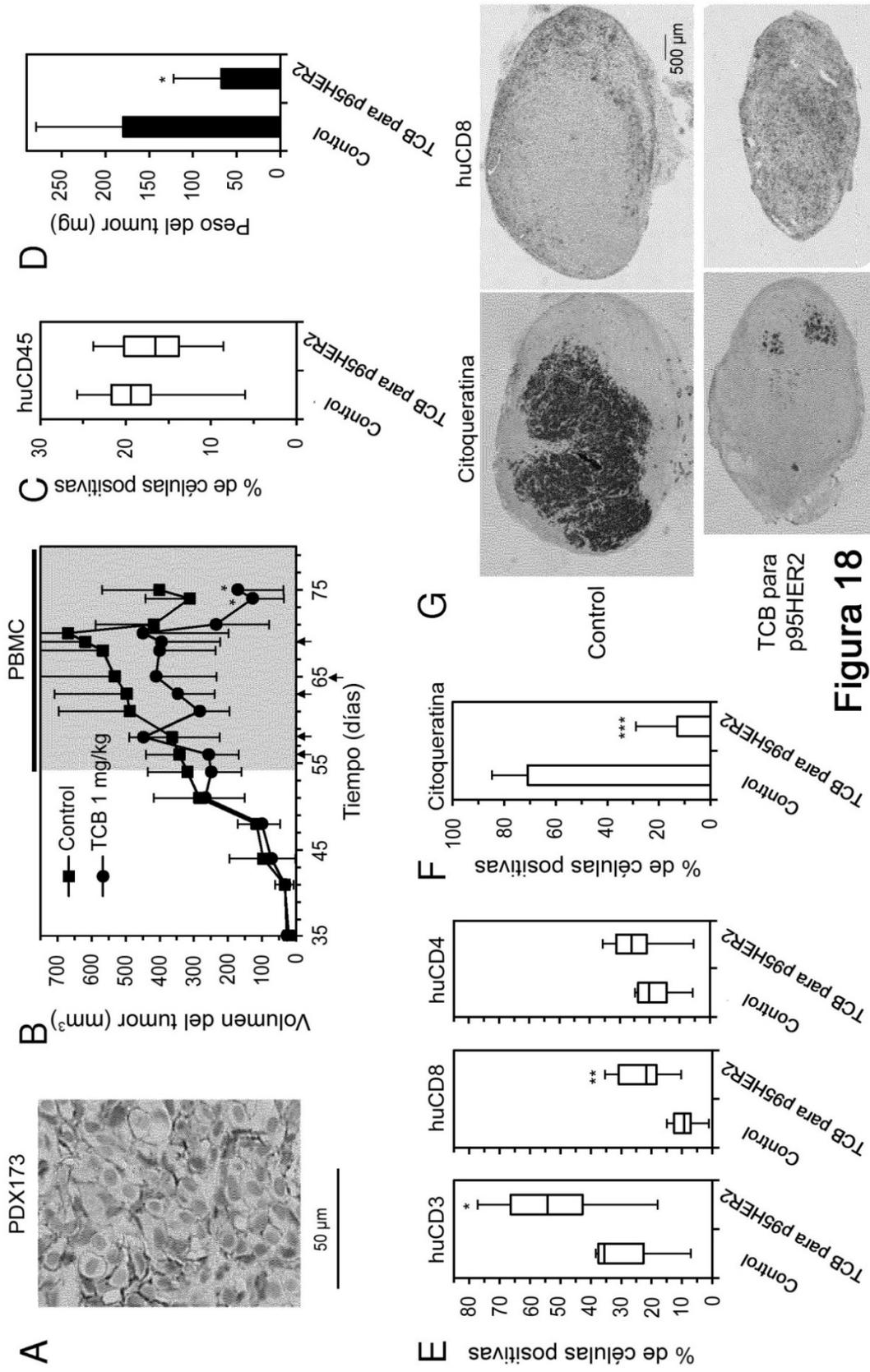
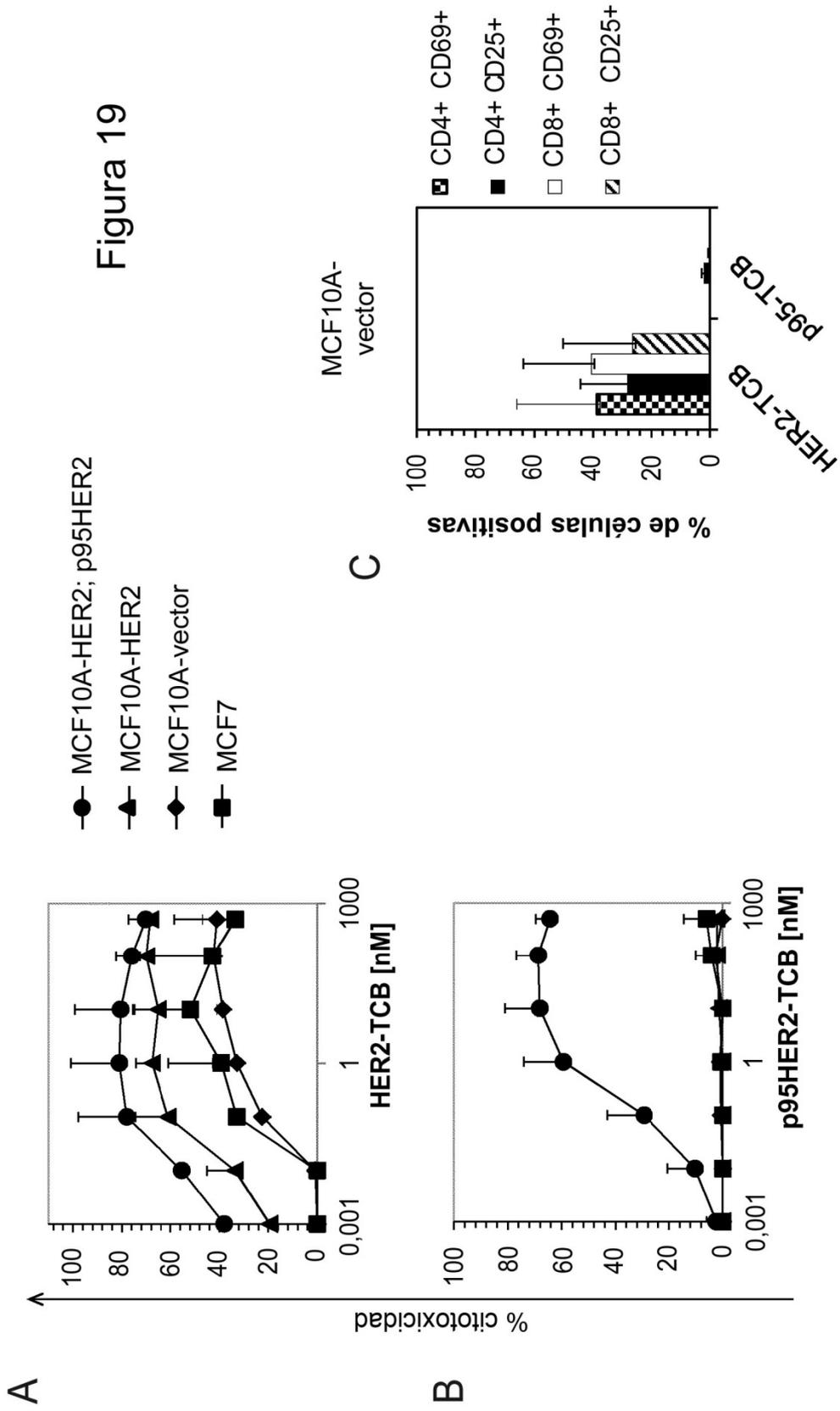


Figura 18

Figura 19



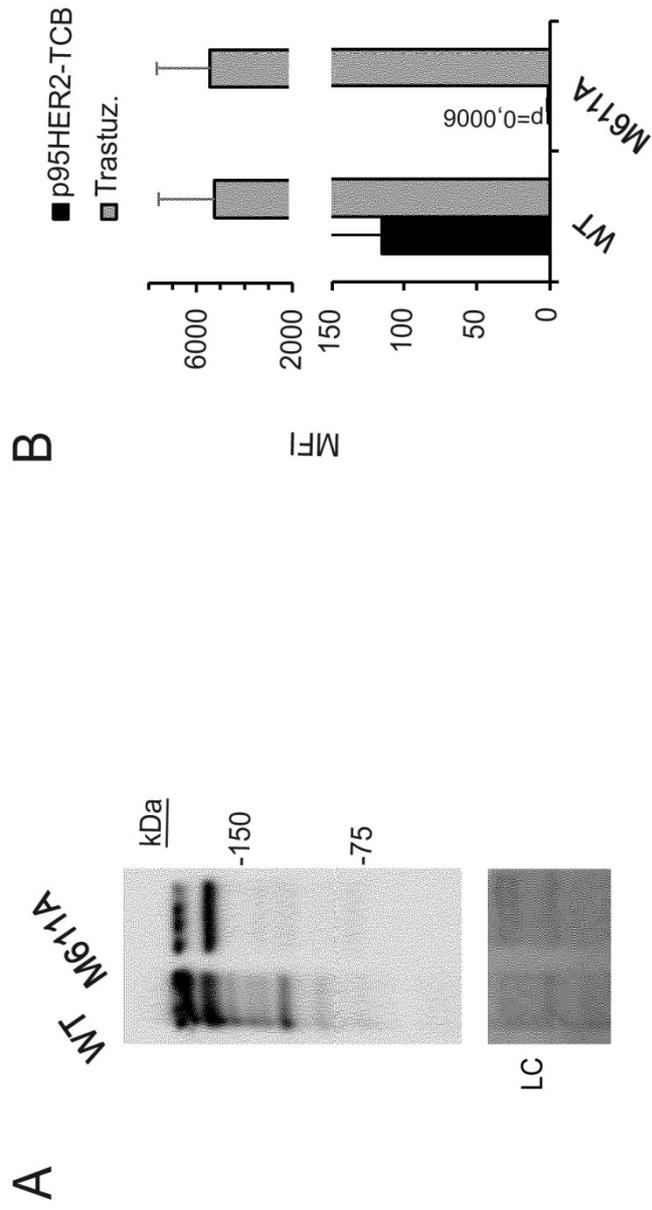


Figura 20