



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 276 735**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01122104 .1**

86 Fecha de presentación : **14.09.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1293514**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2003**

54 Título: **Anticuerpos Fv multiméricos de cadena sencilla en tándem.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

73 Titular/es: **Affimed Therapeutics AG.**
Technologiepark, Im Neuenheimer Feld 582
69120 Heidelberg, DE

72 Inventor/es: **Le Gall, Fabrice;**
Kipriyanov, Sergey;
Reusch, Uwe;
Moldenhauer, Gerhard y
Little, Melvyn

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 276 735 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 Fv multiméricos de cadena sencilla en tándem.

5 La presente invención se refiere a construcciones de anticuerpos Fv multiméricos, a vectores de expresión que codifican dichas construcciones de anticuerpos Fv y a usos de diagnóstico así como terapéuticos de dichas construcciones de anticuerpos Fv multiméricos.

10 Los anticuerpos naturales son en sí mismos dímeros y, por tanto, bivalentes. Si dos células de hibridomas que producen anticuerpos diferentes se fusionan artificialmente, algunos de los anticuerpos producidos por el hibridoma híbrido están compuestos por dos monómeros con especificidades diferentes. Estos anticuerpos biespecíficos también pueden producirse mediante conjugación química de dos anticuerpos. Los anticuerpos naturales y sus derivados biespecíficos son relativamente grandes y caros de producir. Los dominios constantes de anticuerpos de ratón también son la causa principal de la respuesta inmune humana anti-ratón (HAMA), que impiden su uso en gran medida como agentes terapéuticos. También pueden ocasionar efectos no deseados debido a su unión a receptores Fc. Por estas razones, 15 los inmunólogos moleculares se han concentrado en la producción en microorganismos de los fragmentos Fab y Fv mucho más pequeños. Estos fragmentos más pequeños no sólo son más fáciles de producir también son menos inmunogénicos, no tienen funciones efectoras y, debido a su tamaño relativamente pequeño, están más capacitados para penetrar en tejidos y tumores. En el caso de los fragmentos Fab, los dominios constantes adyacentes a los dominios variables juegan un papel principal en la estabilización de los dímeros de cadena pesada y ligera.

20 El fragmento Fv es mucho menos estable y, por tanto, puede introducirse un enlazador peptídico entre los dominios variables de la cadena pesada y ligera para aumentar la estabilidad. Esta construcción se conoce como fragmento Fv de cadena única (scFv). Algunas veces se introduce un puente disulfuro entre los dos dominios para conseguir una estabilidad adicional. Hasta ahora, se han producido anticuerpos tetravalentes basados en scFv mediante la fusión de dominios adicionales de polimerización, tales como el monómero de estreptavidina que forma tetrameros y hélices alfa anfipáticas. Sin embargo, estos dominios adicionales pueden aumentar la inmunogenicidad de la molécula tetravalente.

30 Pueden construirse anticuerpos bivalentes y biespecíficos usando sólo dominios variables de anticuerpo. Un procedimiento bastante eficaz y relativamente sencillo es hacer la secuencia enlazadora entre los dominios V_H y V_L tan corta que éstos no puedan plegarse sobre sí mismos ni unirse uno con el otro. La reducción de la longitud del enlazador a 3-12 restos evita la configuración monomérica de la molécula scFv y favorece el apareamiento intermolecular V_H - V_L con la formación de un dímero "dianticuerpo" scFv no covalente de 60 kDa (Holliger y col., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90, 6444-6448). El formato de dianticoerpo también puede usarse para la generación de anticuerpos biespecíficos recombinantes, que se obtienen mediante la asociación no covalente de dos productos de fusión de cadena única, compuestos por el dominio V_H de un anticuerpo conectado mediante un enlazador corto al dominio V_L de otro anticuerpo. Si se reduce la longitud del enlazador más todavía, por debajo de tres restos puede dar lugar a la formación de trímeros ("trianticuerpo", ~ 90 kDa) o a tetrámeros ("tetranticoerpo", ~ 120 kDa) (Le Gall y col., 1999, FEBS Letters 453, 164-168). Sin embargo, el pequeño tamaño de los dianticoerpos biespecíficos (50-60 kDa) lleva a su rápido aclaramiento del torrente circulatorio a través de los riñones, lo que requiere, por tanto, la aplicación de dosis relativamente altas para terapia. Además, los dianticoerpos biespecíficos sólo tienen un dominio de unión para cada especificidad. Sin embargo, la unión bivalente es un medio importante para incrementar la afinidad funcional y la posibilidad de la selectividad para tipos de células específicas que llevan antígenos densamente agrupados.

45 Kipriyanov y col. (*J. Mol. Biol.*, vol. 293, páginas 41-56) describen un anticuerpo Fv multimérico compuesto de cuatro dominios variables. Los cuatro dominios se unen mediante tres enlazadores. Los enlazadores son cortos (12 restos de aminoácidos), lo que lleva a una formación de dianticoerpos en tándem (todos los sitios de unión al antígeno están formados por los respectivos dominios V_L o V_H de dos cadenas diferentes con cuatro dominios cada uno) o el enlazador central es "largo" (27 restos de aminoácidos) y los otros dos enlazadores son "cortos" (12 restos de aminoácidos), lo que lleva a la formación de un dianticoerpo de cadena sencilla (todos los antígenos están formados por los respectivos dominios V_L y V_H de la misma cadena). Igualmente se describe también en el documento WO 99/57510. En el documento DE 198 16 141 se describe una construcción similar que tiene un enlazador "largo" central y 2 enlazadores "cortos" externos. Una construcción de cadena única en tándem compuesta por los cuatro dominios variables todos unidos por un único aminoácido se describe en el documento DE 199 30 433. Por otro lado, 55 en el documento US 6 025 165 describe un anticuerpo de cadena única que consiste en cuatro dominios variables unidos por un enlazador central que tiene un único aminoácido y dos enlazadores externas que tiene 14 aminoácidos, mientras que se forman en la misma cadena dos sitios de unión al antígeno.

60 De este modo, el problema técnico que subyace a la presente invención es proporcionar nuevos anticuerpos multiméricos que superen las desventajas de los anticuerpos Fv de la técnica anterior y proporcionar una manera general para formar una molécula Fv multimérica con al menos cuatro dominios de unión, que sea monoespecífica o multiespecífica.

65 La solución a dicho problema técnico se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

La presente invención se basa en la observación de que los dímeros, trímeros y tetrámeros de scFv pueden usarse como motivos de multimerización para la construcción de moléculas Fv multiméricas y que, para la producción

ES 2 276 735 T3

de las moléculas Fv multiméricas, el enlazador peptídico introducido entre los dominios variables primero y segundo de un monómero y los dominios segundo y tercero de un monómero deberá ser suficientemente largo para permitir que la molécula se pliegue sobre sí misma, es decir, el enlazador peptídico tendrá una longitud de al menos 12 aminoácidos, preferiblemente de al menos 15 aminoácidos. De este modo, la presente invención proporciona una manera general para formar una molécula Fv multimérica con al menos cuatro dominios de unión que sea monoespecífica o multiespecífica. Cada monómero de la molécula Fv de la presente invención se caracteriza por una unidad V_H/V_L de unión al antígeno y dos dominios variables de anticuerpo que forman unidades V_H/V_L de unión al antígeno tras la unión no covalente a los dominios variables de otros monómeros (motivo de multimerización). Se forman dímeros, trímeros o tetrámeros dependiendo de los dominios variables y de la longitud de los enlazadores peptídicos entre los dominios variables que comprenden los motivos de multimerización (véanse las Figuras 1, 2 y 3).

Se espera que los anticuerpos Fv multiméricos de la presente invención sean muy estables y tengan una mayor capacidad de unión. También deberán ser especialmente útiles para fines terapéuticos, puesto que los anticuerpos dimericos usados hasta el momento son pequeños y probablemente se eliminan fácilmente del torrente circulatorio a través de los riñones. Además, el formato de cadena única de los anticuerpos Fv multiméricos de la presente invención permite que éstos se produzcan en organismos eucariotas y no sólo en bacterias.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un anticuerpo Fv multimérico, caracterizado por las siguientes características:

(a) dos dominios variables próximos que forman una unidad scFv V_H-V_L o V_L-V_H de unión al antígeno; estos dos dominios variables están unidos mediante un enlazador peptídico de al menos 12 restos de aminoácidos; y

(b) otros dos dominios variables próximos que están unidos no covalentemente a dos dominios variables de otro monómero del anticuerpo Fv dando lugar a la formación de dos sitios de unión a antígenos adicionales para formar el motivo de multimerización; estos dos dominios variables de cada monómero se unen mediante un enlazador peptídico compuesto de un máximo de 10 restos de aminoácidos.

Una característica adicional preferida es que la unidad scFv V_H-V_L o V_L-V_H de unión al antígeno formada por los dos dominios próximos de un monómero se unen a los otros dominios variables del motivo de multimerización mediante un enlazador peptídico de al menos 15 restos de aminoácidos, preferiblemente de al menos 20 restos de aminoácidos.

La expresión "anticuerpo Fv" se refiere a un anticuerpo que contiene los dominios variables pero no los dominios constantes.

La expresión "enlazador peptídico" se refiere a cualquier péptido capaz de conectar dos dominios variables con una longitud que depende de los tipos de dominios variables que se van a conectar. El enlazador peptídico puede contener cualquier resto de aminoácido, prefiriéndose los restos de aminoácidos glicina, serina y prolina para el enlazador peptídico que une los dominios variables segundo y tercero.

Un anticuerpo Fv multimérico de la presente invención puede prepararse según procedimientos convencionales. Preferiblemente, dicho anticuerpo Fv se prepara ligando secuencias de ADN que codifican los enlazadores peptídicos con las secuencias de ADN que codifican los dominios variables, de modo que los enlazadores peptídicos conectan los dominios variables dando lugar a la formación de una secuencia de ADN que codifica un monómero del anticuerpo Fv multimérico y expresando las secuencias de ADN que codifican los diversos monómeros en un sistema de expresión adecuado como se describe a continuación en los Ejemplos.

Los anticuerpos Fv de la presente invención pueden modificarse adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la materia, por ejemplo, usando delecciones, inserciones, sustituciones, adiciones y/o recombinaciones y/o cualesquiera otras modificaciones conocidas en la técnica, solas o combinadas. Los procedimientos para introducir estas modificaciones en la secuencia del ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de un dominio variable o de un enlazador peptídico son bien conocidos para los expertos en la materia, véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.

Los anticuerpos Fv de la presente invención pueden comprender al menos un dominio proteico adicional, estando unido dicho dominio proteico mediante enlaces covalentes o no covalentes. La unión puede basarse en la fusión genética según los procedimientos conocidos en la técnica y descritos anteriormente, o puede realizarse, por ejemplo, mediante entrecruzamiento químico como se describe, por ejemplo, en el documento WO 94/04686. El dominio adicional presente en la proteína de fusión que comprende el anticuerpo Fv empleado según la invención preferiblemente puede estar unido mediante un enlazador flexible, de forma ventajosa a un enlazador peptídico, en el que dicho enlazador peptídico comprende aminoácidos unidos en un péptido plural e hidrófilo de longitud suficiente para abarcar la distancia entre el extremo C-terminal de dicho dominio proteico adicional y el extremo N-terminal del anticuerpo Fv o viceversa. La proteína de fusión descrita anteriormente puede comprender además un enlazador susceptible de escisión o un sitio de escisión para proteínas. La proteína de fusión también puede comprender una etiqueta, como una etiqueta de histidina, por ejemplo (His)₆.

ES 2 276 735 T3

En una realización preferida de la presente invención, los monómeros del anticuerpo Fv multimérico comprende cuatro dominios variables y los dominios variables tercero y cuarto de los monómeros están unidos mediante un enlazador peptídico de 10 restos de aminoácidos o menos, preferiblemente menos de cinco restos de aminoácidos. Incluso en una realización más preferida, los dominios tercero y cuarto están unidos directamente sin que intervengan restos de aminoácidos.

En otra realización preferida del anticuerpo Fv multimérico de la presente invención, los dominios variables segundo y tercero de los monómeros del anticuerpo están unidos mediante un enlazador peptídico de al menos 12 restos de aminoácidos, preferiblemente de al menos 15 restos de aminoácidos. Preferiblemente, el número máximo de restos de aminoácidos es 30. En una realización incluso más preferida, dicho enlazador peptídico tiene la secuencia de aminoácidos (Gly₄Ser)₄.

En otra realización preferida del anticuerpo Fv multimérico de la presente invención, los dominios variables tercero y/o cuarto son más cortos en al menos un resto de aminoácido en sus extremos N y/o C-terminales. En algunas circunstancias, como se describe en la solicitud de patente alemana 100 63 048.0, esta forma truncada aporta una mejor estabilidad de la molécula.

En una realización especialmente preferida del anticuerpo Fv multimérico de la presente invención, el orden de los dominios de un monómero es V_H-V_L.

En algunos casos podría ser deseable potenciar la asociación de dos dominios variables. Por lo tanto, en una realización preferida adicional del anticuerpo Fv multimérico de la presente invención, la unión de al menos un par de dominios variables se potencia al menos mediante un puente disulfuro intermolecular. Por lo tanto, esto puede lograrse modificando las secuencias de ADN que codifican los dominios variables, por ejemplo, introduciendo codones de cisteína. Los dos sitios más prometedores para introducir enlaces disulfuro parecen ser V_H44-V_L100 que conecta la región estructural 2 de la cadena pesada con la región estructural 4 de la cadena ligera y V_H105-V_L43 que une la región estructural 4 de la cadena pesada con la región estructural 2 de la cadena ligera.

En una realización preferida adicional de la presente invención, el anticuerpo Fv multimérico es un dímetro tetravalente, trímero hexavalente o tetrámero octavalente. La formación de estas formas esta determinada preferiblemente por dominios V_H y V_L particulares que comprenden el motivo de multimerización y por la longitud del enlazador.

En otra realización preferida de la presente invención, el anticuerpo Fv multimérico es un anticuerpo biespecífico, trispecífico o tetraespecífico.

La multimerización de las subunidades monoméricas puede facilitarse mediante la presencia de un motivo de dimerización en el extremo C-terminal del cuarto dominio variable que, preferiblemente es un (poli) péptido unido directamente a través de un enlace peptídico. Los expertos en la materia conocen ejemplos de estos motivos que incluyen estreptavidina y hélices alfa anfipáticas. Por lo tanto, en una realización preferida adicional, se fusiona un motivo de dimerización con el último dominio de al menos dos monómeros del anticuerpo Fv multimérico de la presente invención.

Para aplicaciones terapéuticas en particular, puede unirse covalente o no covalentemente al menos un monómero del anticuerpo multimérico de la invención con una sustancia biológicamente activa (por ejemplo, citocinas u hormonas de crecimiento), un agente químico (por ejemplo, doxorubicina, ciclosporina), un péptido (por ejemplo, α -Amanitina), o una proteína (por ejemplo, granzima A y B).

En una realización aún más preferida, el anticuerpo Fv multimérico de la presente invención es (I) un anticuerpo monoespecífico capaz de unirse específicamente al antígeno CD19 de linfocitos B o al antígeno carcinoembrionario (CEA); o (II) un anticuerpo biespecífico capaz de unirse específicamente a (a) CD19 y al complejo CD3 del receptor de la célula T, (b) CD19 y al complejo CD5 del receptor de la célula T, (c) CD19 y al antígeno CD28 en los linfocitos T, (d) CD19 y CD16 en células destructoras naturales, macrófagos y monocitos activados, (e) CEA y CD3, (f) CEA y CD28, (g) CEA y CD16. Las secuencias de nucleótidos de los dominios variables ya se han obtenido y, en el caso del anticuerpo anti-CD19, descrito (Kipriyanov y col., 1996, J. Immunol. Methods 200, 51-62), anti-CD3 (Kipriyanov y col., 1997, Protein Engng. 10, 445-453), anti-CD28 (Takemura y col., 2000, FEBS Lett. 476, 266-271), anti-CD16 (Solicitud de Patente Alemana DE 199 37 264 A1), anti-CEA (Griffiths y col., 1993, EMBO J. 12, 725-734) y anti-CD5 (Better y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 457-461).

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de un anticuerpo Fv multimérico según la presente invención, en el que (a) las secuencias de ADN que codifican los enlazadores peptídicos se ligan con las secuencias de ADN que codifican los dominios variables de modo que los enlazadores peptídicos conectan los dominios variables dando lugar a la formación de una secuencia de ADN que codifica un monómero del anticuerpo Fv multimérico y (b) las secuencias de ADN que codifican los diversos monómeros se expresan en un sistema de expresión adecuado. Las diversas etapas de este procedimiento pueden realizarse según procedimientos convencionales, por ejemplo, procedimientos descritos en Sambrook y col., o descritos en los Ejemplos a continuación.

La presente invención también se refiere a secuencias de ADN que codifican el anticuerpo Fv multimérico de la presente invención y a vectores, preferiblemente vectores de expresión que contienen dichas secuencias de ADN.

ES 2 276 735 T3

Pueden utilizarse diversos sistemas vector de expresión/hospedador para contener y expresar secuencias que codifiquen un anticuerpo Fv multimérico. Estos incluyen, pero sin limitaciones, microorganismos, tales como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, plásmidos o vectores de expresión de ADN de cósmidos; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras, sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión virales (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformadas con vectores de expresión virales (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322) o sistemas de células animales. La invención no se limita a la célula hospedadora empleada.

Los “elementos de control” o las “secuencias reguladoras” son aquellas regiones no traducidas de los vectores (potenciadores, promotores, regiones 5' y 3' no traducidas) que interactúan con proteínas de la célula hospedadora para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Estos elementos pueden variar en su potencia y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y hospedador utilizado, puede usarse cualquiera de los diversos elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles, tales como el promotor híbrido LacZ del fagémido Bluescript™ (Stratagene, La Jolla, Calif.) o del plásmido pSport1™ (Gibco BRL) y similares. El promotor de la polihedrina de baculovirus puede usarse en células de insecto. En el vector pueden clonarse promotores o potenciadores derivados de los genomas de células vegetales (por ejemplo, genes de choque térmico, RUBISCO y de proteínas de almacenamiento) o de virus vegetales (por ejemplo, promotores virales o secuencias líder). En sistemas de células de mamíferos, se prefieren los promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Si es necesario generar una línea celular que contenga copias múltiples de la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo Fv multimérico, pueden usarse vectores basados en los virus SV40 o EBV con un marcador seleccionable apropiado.

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse varios vectores de expresión dependientes del uso pretendido para el anticuerpo Fv multimérico. Los vectores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitaciones, el vector de expresión pSKK para la expresión en bacterias.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pueden usarse varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles, tales como el factor alfa, la alcohol oxidasa y PGH. Para revisiones, véase Grant y col. (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544.

En los casos en que se usan vectores de expresión vegetales, la expresión de las secuencias que codifican el anticuerpo Fv multimérico puede estar dirigida por cualquier de los diversos promotores. Por ejemplo, pueden usarse promotores virales, tales como los promotores 35S y 19S de CaMV solos o en combinación con la secuencia líder omega del TMV (Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311). Alternativamente, pueden usarse promotores vegetales tales como los promotores de la subunidad pequeña de RUBISCO o de choque térmico (Coruzzi, G. y col (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie, R. y col. (1984) *Science* 224:838-843 y Winter, J. y col. (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales mediante transformación directa de ADN o mediante transfección mediada por patógeno. Estas técnicas se describen en varias revisiones generalmente disponibles (véase, por ejemplo, Hobbs, S. o Murry, L. E. en McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, Nueva York, N.Y.; pág. 191-196).

También puede usarse un sistema de insecto para expresar el anticuerpo Fv multimérico. Por ejemplo, en uno de estos sistemas, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el anticuerpo Fv multimérico pueden clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de la polihedrina, y colocarse bajo el control del promotor de la polihedrina. La inserción satisfactoria del anticuerpo Fv multimérico hará que se inactive el gen de la polihedrina y producirá virus recombinantes que carecen de la proteína de la cubierta. A continuación, los virus recombinantes pueden usarse para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que puede expresarse APOP (Engelhard, E. K. y col. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3224-3227).

En células hospedadoras de mamíferos, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en que se usa un adenovirus como vector de expresión, las secuencias que codifican el anticuerpo Fv multimérico pueden ligarse a un complejo de transcripción/traducción de adenovirus, que consiste en las secuencias promotora tardía y líder tripartita. Puede usarse la inserción en una región E1 o E3 no esenciales del genoma del virus para obtener un virus viable que sea capaz de expresar el anticuerpo Fv multimérico en células hospedadoras infectadas (Logan, J. y Shenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659). Además, pueden usarse potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV), para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamíferos.

También pueden usarse cromosomas artificiales humanos (HAC) para suministrar fragmentos de ADN más grandes que los que puede contener y expresar un plásmido. Se construyen HACs de 6 a 10 M y se suministran mediante procedimientos de suministro convencionales (liposomas, polímeros amino policatiónicos o vesículas) para fines terapéuticos.

También pueden usarse señales de iniciación específicas para lograr una traducción más eficaz de las secuencias que codifican el anticuerpo Fv multimérico. Estas señales incluyen el codon de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En

los casos en los que las secuencias que codifican el anticuerpo Fv multimérico, su codon de iniciación y las secuencias antes del extremo 5' se insertan en el vector de expresión adecuado, puede que no se necesiten señales de control de la transcripción o de la traducción adicionales. Sin embargo, en los casos en los que sólo se inserta la secuencia codificadora, deberán proporcionarse señales exógenas de control de la traducción que incluyan el codon de iniciación
 5 ATG. Además, el codon de iniciación debe estar en la fase de lectura correcta para asegurar la traducción de la inserción completa. Los elementos exógenos de traducción y los codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores que sean apropiados para el sistema celular en particular que se usa, tal como los descritos en la bibliografía (Scharf, D. y col. (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162).

10 Además, puede elegirse una cepa de la célula hospedadora por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada en la forma deseada. También puede usarse un procesamiento postraduccional que escinda una forma "prepro" de la proteína para facilitar la inserción, el plegamiento y/o la función correctos. En la *American Type Culture Collection* (ATCC; Bethesda, Md.) están disponibles diferentes
 15 células hospedadoras que tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para las actividades postraducionales (por ejemplo, CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y W138) y pueden elegirse de modo que se asegure la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña.

Para una producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable.
 20 Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable el anticuerpo Fv multimérico pueden transformarse usando vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógena y un gen marcador susceptible de selección en el mismo vector o en un vector independiente. Tras la introducción del vector, puede permitirse que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de pasarlas a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el
 25 crecimiento y la recuperación de células que expresan eficazmente las secuencias introducidas. Los clones resistentes de las células transformadas estables pueden proliferar usando técnicas de cultivos tisulares apropiadas para el tipo de célula.

Para recuperar las líneas celulares transformadas puede usarse cualquiera de los diversos sistemas de selección.
 30 Estos incluyen, pero sin limitaciones, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler, M. y col. (1977) *Cell* 11:223-32) y de la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, I. y col. (1980) *Cell* 22:817-23) que pueden emplearse en células tk⁻ o aprt⁻, respectivamente. También puede usarse la resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como base para la selección, por ejemplo, dhfr que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, M y col. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3567-70); npt, que confiere resistencia a los aminoglicosidos neomicina y G-
 35 418 (Colbere-Garapin, F. y col (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14) y als o pat, que confieren resistencia a clorsulfurona y fosfotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, *supra*). Se han descrito genes susceptibles de selección adicionales, por ejemplo, trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman, S. C. y R. C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:8047-51). Recientemente, ha ganado popularidad el uso de marcadores visibles, siendo marcadores como antrocianinas, β -
 40 glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, ampliamente utilizados no sólo para identificar transformantes sino también para cuantificar la cantidad de expresión transitoria o estable de proteína atribuible a un sistema de vector específico (Rhodes, C. A. y col. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131).

Un vector de expresión en especial es pSKK2-scFv_{L18}anti-CD3-LL-scFv_{L10}anti-CD19(pSKK2-scFv3LL Db19)
 45 (depositado en el DSMZ según el Tratado de Budapest como DSM 14470 el 22 de agosto de 2001 o pSKK2-scFv_{L18}anti-CD19-LL-scFv_{L10}anti-CD3(pSKK2-scFv19LL Db3) (depositado en el DSMZ según el Tratado de Budapest como DSM 14471 el 22 de agosto de 2001).

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo Fv multi-
 50 mérico de la presente invención, una secuencia de ADN o un vector de expresión, combinado preferiblemente con vehículos farmacéuticos adecuados. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Estos vehículos pueden formularse mediante procedimientos convencionales y pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. La administración de las composiciones
 55 adecuadas puede llevarse a cabo a través de diversos medios, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La vía de administración, por supuesto, depende de la naturaleza de la enfermedad, por ejemplo, un tumor, y del tipo de compuesto contenido en la composición farmacéutica. El médico determinará el régimen de dosificación y otros factores clínicos. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el
 60 área de superficie corporal, la edad, el sexo, la composición en particular que se va a administrar, el tiempo y la vía de administración, la clase de trastorno, el estado de salud general y otros fármacos que se administran simultáneamente.

Los usos médicos preferidos de los compuestos de la presente invención son: (a) el tratamiento de una enfermedad relacionada con un virus, una bacteria, un tumor o un prión, (b) la aglutinación de células sanguíneas rojas, (c) la
 65 unión de células citotóxicas del sistema inmune, por ejemplo, células T o citolíticas naturales, a células tumorales o (d) la unión de citocinas de activación, preferiblemente IL-1, IL-2, IFN γ , TNF α o GM-CSF, sustancias citotóxicas (por ejemplo, doxorubicina, ciclosporina, α -Amanitina o una proteasa, preferiblemente Granzima B, a una célula diana.

ES 2 276 735 T3

Un objeto adicional de la presente invención es el uso de un anticuerpo Fv multimérico de la presente invención para diagnóstico. Para uso en la investigación diagnóstica, también la presente invención proporciona kits, que comprenden un anticuerpo multimérico de la presente invención. El anticuerpo Fv puede estar marcado de forma detectable. En una realización preferida, dicho kit permite el diagnóstico mediante un ELISA que contiene el anticuerpo Fv unido a un soporte sólido, por ejemplo, un disco de microvaloración de poliestireno o un papel de nitrocelulosa, usando técnicas conocidas en la materia. Alternativamente, dicho kit se basa en un RIA y contiene dicho anticuerpo Fv marcado con un isótopo radiactivo. En una realización preferida del kit de la invención, el anticuerpo se marca con enzimas, compuestos fluorescentes, compuestos luminiscentes, sondas ferromagnéticas o compuestos radiactivos.

La presente invención además se describe con respecto a las figuras.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1, 2 y 3

Esquemas de las moléculas Fv multiméricas dependientes de los dominios de anticuerpos en particular y de la longitud del enlazador peptídico LL entre los dominios variables que comprenden el motivo de multimerización

Abreviaturas L0: los dominios V_H y V_L se conectan directamente sin intervención del péptido enlazador; L1: secuencia enlazadora que codifica el resto Ser; L10: secuencia enlazadora que codifica el polipéptido SerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGly que conecta los dominios V_H y V_L; LL: secuencia enlazadora que codifica el polipéptido (Gly₄Ser)₄ que conecta los fragmentos scFv híbridos; L18: secuencia enlazadora que codifica el polipéptido SerAlaLysThrThrProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgVal que conecta los dominios V_H y V_L.

Figuras 4 y 5

Esquema de la construcción de los plásmidos pHOG scFv₁₈αCD3-LL-scFv₁₀αCD19 y pHOG scFv₁₈αCD19-LL-scFv₁₀αCD3

Abreviaturas c-myc: secuencia que codifica un epítipo reconocido por el AcM 9E10; His: secuencia que codifica seis restos de histidina en el extremo C-terminal; PelB: secuencia del péptido señal de la peptidasa bacteriana (líder PelB); rbs: sitio de unión a ribosoma; Stop: codon de parada (TAA); V_H y V_L: regiones variables de la cadena pesada y ligera; L10: secuencia enlazadora que codifica el polipéptido SerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGly que conecta los dominios V_H y V_L; LL: secuencia enlazadora que codifica el polipéptido (Gly₄Ser)₄ que conecta los fragmentos scFv híbridos; L18: secuencia enlazadora que codifica el polipéptido SerAlaLysThrThrProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgVal que conecta los dominios V_H y V_L; B: BamHI, Ea: EagI, E: EcoRI, Nc: NcoI, N: NotI, P: PvuII, X: XbaI.

Figura 6

Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del plásmido pSKK2 scFv3-LL-Db19

Abreviaturas cola de His6: secuencia que codifica seis restos de histidina en el extremo C-terminal; β-lactamasa: gen que codifica la β-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina; pb: pares de bases; epítipo c-myc: secuencia que codifica un epítipo reconocido por el AcM 9E10; Lac P/0: promotor/operador del operon lac st; líder Pel B: secuencia del péptido señal de la peptidasa bacteriana; V_H y V_L: regiones variables de la cadena pesada y ligera; L10: secuencia enlazadora que codifica el polipéptido SerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGly que conecta los dominios V_H y V_L; LL: secuencia enlazadora que codifica el polipéptido (Gly₄Ser)₄ que conecta los fragmentos scFv híbridos; L18: secuencia enlazadora que codifica el polipéptido SerAlaLysThrThrProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgVal que conecta los dominios V_H y V_L; rbs: sitio de unión a ribosomas; V_H y V_L: regiones variables de la cadena pesada y ligera; hok-sok: locus de ADN estabilizador del plásmido; lacI: gen que codifica el represor lac; lac P/0: promotor/operador del operon lac st; lacZ': gen que codifica el péptido α de la galactosidasa β; gen skp: gen que codifica el factor periplásmico bacteriano Skp/OmpH; tLPP: secuencia de nucleótidos del terminador de lipoproteína; M13 ori: origen de la replicación del ADN; pBR322ori: origen de la replicación del ADN; tHP: terminador potente de la transcripción; SD1: sitio de unión al ribosoma (Shine Dalgarno) derivado del gen lacZ de E. coli (lacZ); SD2 y SD3: secuencia de Shine Dalgarno para la proteína 10 del gen T7 fuertemente expresada (T7g10).

Figura 7

Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del plásmido pSKK2 scFv19-LL-Db3

Abreviaturas cola de His6: secuencia que codifica seis restos de histidina en el extremo C-terminal; β-lactamasa: gen que codifica la β-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina; pb: pares de bases; epítipo c-myc: secuencia que codifica un epítipo reconocido por el AcM 9E10; Lac P/0: promotor/operador del operon lac st; líder PelB: secuencia del péptido señal de la peptidasa bacteriana; V_H y V_L: regiones variables de la cadena pesada y ligera; L10: secuencia enlazadora que codifica el polipéptido SerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGly que conecta los dominios V_H y V_L; LL: secuencia enlazadora que codifica el polipéptido (Gly₄Ser)₄ que conecta los fragmentos scFv híbridos; L18: secuencia enlazadora que codifica el polipéptido SerAlaLysThrThrProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArg

ES 2 276 735 T3

Val que conecta los dominios V_H y V_L ; rbs: sitio de unión a ribosoma; hok-sok: locus de ADN estabilizador del plásmido; lacI: gen que codifica el represor *lac*; lac P/O: promotor/operador del operon *lac* st; lacZ': gen que codifica el péptido α de la galactosidasa β ; gen *skp*: gen que codifica el factor periplásmico bacteriano Skp/OmpH; tLPP: secuencia de nucleótidos del terminador de lipoproteína; *M13* ori: origen de la replicación del ADN; *pBR322ori*: origen de la replicación del ADN; tHP: terminador potente de la transcripción; SD1: sitio de unión al ribosoma (Shine Dalgarno) derivado del gen *lacZ* de *E. coli* (*lacZ*); SD2 y SD3: secuencia de Shine Dalgarno para la proteína 10 del gen T7 fuertemente expresada (T7g10).

Figura 8

10 *Análisis de los contenidos de proteína de los picos tras IMAC*

La electroforesis se realizó en condiciones reductoras; Inmunotransferencia con un anticuerpo monoclonal anti-*c-myc*, en el caso de las moléculas scFv3 - Db19 (Figura 8A) y scFv 19 x Db3 (Figura 8B).

Figura 9

Perfiles de elución de FPLC de la cromatografía de exclusión molecular

20 Se usó una columna Superdex 200 HR10/30 calibrada y el análisis de los contenidos de proteína de los picos mediante inmunofluorescencia se realizó con un anticuerpo monoclonal anti-*c-myc*, en el caso de las moléculas scFv3 - Db19 (Figura 9A) y scFv19 - Db3 (Figura 9B).

Figura 10

25 *Perfiles de elución de FPLC de la cromatografía de exclusión molecular*

Se usó una columna de Superdex 200 HR10/3 calibrada para las moléculas scFv3 - Db19, scFv19 - Db3, scFv19 - scFv3 y scFv3 - scFv19.

Figura 11

Resultados de la citometría de flujo de las células Jurkat CD3⁺ y JOK-1 CD19⁺

Figura 12

Análisis de la retención en la superficie celular en células JOK-1 CD19⁺ (A, B) y Jurkat CD3⁺ (C, D) para las moléculas scFv3 - scFv19 y scFv3 - Db19 (A, C) y para las moléculas scFv19 - scFv3 y scFv 19 x Db3 (B, D)

40 Los Ejemplos siguientes ilustran la invención.

Ejemplo 1

45 *Construcción de los plásmidos pSKK2 scFv_{L18}anti-CD3-LL-scFv_{L10}anti-CD19 (scFv3 - Db19) y pSKK2 scFv_{L18}anti-CD19-LL-scFv_{L10}anti-CD3 (scFv19 - Db3) para la expresión de moléculas Fv multiméricas en bacterias*

Para la generación de construcciones Fv multiméricas, se usaron los plásmidos pHOG_HD37, pHOG_Dia_HD37, pHOG_mOKT3+NotI y pHOG_Dia_mOKT3 que codifican los fragmentos derivados de anticuerpo del hibridoma HD37 específico del CD19 humano (Kipriyanov y col., 1996, J. Immunol. Meth. 196, 51-62; Le Gall y col., 1999, FEBS Lett., 453, 164-168) o del hibridoma OKT3 específico para el CD3 humano (Kipriyanov y col., 1997, Protein Eng. 10, 445-453).

El gen de scFv_{L10} anti-CD19 seguido de un segmento que codifica un epítipo de *c-myc* y una cola hexahistidina se cortó con PvuII/XbaI del plásmido pHOG Dia HD37 y se clonó de nuevo en el vector pDISC-1 LL alineado con PvuII/XbaI (Kipriyanov y col., 1999, J. Mol. Biol. 293, 41-56) (Figura 4). Este plásmido híbrido se alineó con NcoI/NotI y se ligó en este plásmido el gen que codifica scFv_{L10} cortado con NcoI/NotI del plásmido pHOG mOKT3 + NotI. El plásmido obtenido es el pHOG scFv_{L18} α CD3-LL-scFv_{L10} α CD19 (scFv3 - Db19) (Figura 4).

También se usó el plásmido híbrido alineado con NcoI/NotI para el ligamiento del gen que codifica scFv_{L18} α CD19 del plásmido pHOG_HD37, el plásmido obtenido es el pHOG scFv_{L18} α CD19-LL-scFv_{L10} α CD19 (scFv19 x Db19) (Figura 4). Este plásmido se alineó con PvuII/XbaI y el gen scFv_{L10} seguido por un segmento que codifica un epítipo de *c-myc* y una cola hexahistidina se cortó con PvuII/XbaI del plásmido pHOG mDia OKT3. El plásmido obtenido es el pHOG scFv_{L18} α CD19-LL-scFv_{L10} α CD3 (scFv19 - Db3) (Figura 5).

65 Para aumentar la producción de fragmentos funcionales de anticuerpo en el periplasma bacteriano, se generó un vector de expresión pSKK2 optimizado. Este vector se construyó sobre el plásmido pHKK como base (Horn, 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol., 46, 524-532) que contiene el sistema de suicidio celular sin plásmido, hok/sok (Thisted y col., 1994, EMBO J., 13, 1950-1956). En primer lugar, se amplificó por PCR el gen que codifica el híbrido scFv V_H -3-

ES 2 276 735 T3

V_L19 a partir del plásmido pHOG3-19 (Kipriyanov y col., 1998, Int. J. Cancer 77, 763-772) usando los cebadores 5-NDE, 5'-GATATACATATGAAATACCTATTGCCTACGGC, y 3-AFL, 5'-CGAATTCTTAAGTTAGCACAGGCCTC TAGAGACACACAGATCTTTAG. El fragmento de PCR de 921 pb resultante se digirió con *NdeI* y *AflII* y se clonó en el plásmido pHKK alineado con *NdeI/AflII*, generando el vector pHKK3-19. Para delecionar un sitio *XbaI* adicional, se amplificó un fragmento del plásmido pHKK que contenía parte del extremo 3'-terminal del gen *lacI* (codifica el represor *lac*), el potente terminador de la transcripción t_{HP} y el promotor/operador de *lac* de tipo silvestre se amplificaron mediante PCR usando los cebadores 5-NAR, 5'-CACCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCC y 3-NDE, 5'-GGTATTTTCATATGTATATCTCCTTCTTCAGAAATTCGTAATCATGG. El fragmento de ADN resultante de 329 pb se digirió con *NarI* y *NdeI* y se clonó en el plásmido pHKK3-19 alineado *NarI/NdeI* generando el vector pHKK□Xba. Para introducir un gen que codifica el factor periplásmico Skp/OmpH para una mayor producción de anticuerpo recombinante (Bothmann y Plückthun, 1998, Nat. Biotechnol., 16, 376-380), se amplificó por PCR el gen *skp* con los cebadores *skp*-3, 5'-CGAATTCTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAAAGTGGTTATTAGCTGCAGG y *skp*-4, 5'-CGAATTCTCGAGCATTATTTAACCTGTTTCAGTACGTCGG usando como molde el plásmido pGAH317 (Holck y Klepe, 1988, Gene, 67, 117-124). El fragmento de PCR resultante de 528 pb se digirió con *AflII* y *XhoI* y se clonó en el plásmido pHKK□Xba digerido con *AflII/XhoI* dando lugar al plásmido de expresión pSKK2.

Los plásmidos pHOG scFv_{L18}αCD3-LL-scFv_{L10}αCD19 (scFv-- Db19) y pHOG scFv_{L18}αCD19-LL-scFv_{L10}αCD3 (scFv19 - Db3) se cortaron con *NcoI/XbaI* y se ligaron en el plásmido pSKK2 alineado con *NcoI/XbaI*. Los plásmidos resultantes son pSKK2 scFv_{L18}αCD3-LL-scFv_{L10}αCD19 y pSKK2 scFv_{L18}αCD19-LL-scFv_{L10}αCD3. En las Figuras 6 y 7 se proporcionan las secuencias completas de nucleótidos y de aminoácidos, respectivamente.

Ejemplo 2

Expresión y purificación de las moléculas de Fv multiméricas en bacterias

La cepa RV308 de *E. coli* K12 (Maurer y col., 1980, J. Mol. Biol. 139, 147-161) transformada con los plásmidos de expresión pSKK2 scFv_{L18}αCD3-LL-scFv_{L10}αCD19 y pSKK2 scFv_{L18}αCD19-LL-scFv_{L10}αCD3 se cultivó durante una noche en medio 2xYT con 50 μg/ml de ampicilina y glucosa 100 mM (2xYT_{GA}) a 28°C. Se cultivaron diluciones (1:50) de los cultivos de una noche en 2xYT_{GA} en frascos de cultivo a 28°C con agitación a 200 rpm. Cuando los cultivos llegaban a una DO₆₀₀ = 0,8, se sedimentaron las bacterias mediante centrifugación a 5.000 x g durante 10 min y a 20°C y se resuspendieron en el mismo volumen de medio YTBS nuevo (2xYT que contenía sorbitol 1 M y glicina betaína 2,5 mM; Blacwell y Horgan, 1991, FEBS Letters. 295, 10-12) que contenía 50 μg/ml de ampicilina. Se añadió IPTG a una concentración final de 0,2 mM y se continuó el crecimiento a 20°C durante 18-20 h. Las células se recogieron mediante centrifugación a 9.000 x g durante 20 min y a 4°C. Para aislar las proteínas periplásmicas solubles, las bacterias se resuspendieron en el 5% del volumen inicial de Tris-HCl 50 mM, sacarosa al 20%, EDTA 1 M, pH 8,0, enfriado en hielo. Después de 1 h de incubación en hielo con agitación ocasional, los esferoblastos se centrifugaron a 30.000 x g durante 30 min a 4°C, dejando el extracto periplásmico soluble con el sobrenadante y los esferoblastos más el material periplásmico insoluble como el sedimento. Las fracciones periplásmicas se dializaron frente al tampón inicial (Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, imidazol 50 mM, pH 7,0) a 4°C. La solución dializada que contenía el producto recombinante se centrifugó a 30.000 x g durante 30 min a 4°C. El producto recombinante se concentró mediante precipitación con sulfato amónico (concentración final al 70% de saturación). El precipitado de proteínas se recogió por centrifugación (10.000 x g, 4°C, 40 min) y se disolvió en el 10% del volumen inicial de Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,0. Se realizó una cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) a 4°C usando una columna de Sefarosa quelante (Pharmacia) cargada con Cu²⁺ y equilibrada con Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,0 (tampón inicial). La muestra se cargó pasando ésta por la columna. A continuación se lavó con veinte volúmenes de columna de tampón inicial seguido de tampón inicial con imidazol 50 mM hasta que la absorbancia (280 nm) del eluido era mínima (aproximadamente treinta volúmenes de columna). El material absorbido se eluyó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, imidazol 250 mM, pH 7,0. Las fracciones de elución que contenían las moléculas de Fv multiméricas se identificaron mediante análisis por inmunotransferencia usando el AcM anti-*c-myc* 9E10 realizado como se describe previamente (Kipriyanov y col., 1994, Mol. Immunol. 31, 1047-1058) como se ilustra en la Figura 8A para scFv3 - Db19 y en la Figura 8B para scFv19 - Db3.

Las fracciones positivas se recogieron y se concentraron en un dispositivo de filtración en centrífuga Ultrafree-15 (Millipore Corporation, Eschborn, Alemania) hasta 0,5 ml.

Se realizó una purificación adicional de las moléculas Fv multiméricas mediante FPLC de exclusión molecular en una columna de Superdex 200 HR10/30 (Pharmacia) en PBSI (fosfato sódico 15 mM, NaCl 0,15 M, imidazole 50 mM, pH 7,0). Los volúmenes de la muestra para la cromatografía preparativa fueron de 500 μl y el flujo fue de 0,5 ml/min, respectivamente. La columna se calibró con kits de calibración para filtración en gel de alto y bajo peso molecular (Pharmacia). Las fracciones de elución que contenían las moléculas de Fv multiméricas se identificaron mediante análisis por inmunotransferencia usando el AcM anti-*c-myc* 9E10 realizado como se describe previamente (Kipriyanov y col., 1994, Mol. Immunol. 31, 1047-1058) y los resultados para las moléculas scFv3 - Db19 y scFv19 - Db3 se presentan en la Figura 9A y 9B, respectivamente. Las fracciones se recogieron y se conservaron individualmente en hielo.

Las moléculas Fv generadas se compararon con dos tándems scFv-scFv, scFv3 - scFv19 y scFv19 - scFv3 (Figura 10), producidos y purificados en las mismas condiciones. La Figura 10 muestra claramente que se obtenían formas de mayor peso molecular para scFv3 x Db19 y scFv19 x Db3 en comparación con scFv3 x scFv19 y scFv19 x

ES 2 276 735 T3

scFv3. El pico principal para las moléculas scFv3 - scFv19 y scFv19 - scFv3 corresponde a un peso molecular de aproximadamente 67 kDa y para scFv3 - Db19 y scFv19 - Db3 de aproximadamente 232 kDa. La presencia de los motivos de dimerización en el extremo C-terminal de la molécula tiene un efecto positivo para la multimerización de las moléculas.

5

Ejemplo 3

Caracterización de las moléculas Fv multiméricas por citometría de flujo

10 Para la citometría de flujo se usaron la línea Jurkat de leucemia aguda de células T CD3⁺/CD19⁻ y la línea JOK-1 de células B CD19⁺/CD3⁻. Brevemente, se incubaron 5×10^5 células en 50 μ l de medio RPMI 1640 (GIBCO BRL, Eggenstein, Alemania) suplementado con STF al 10% y azida sódica al 0,1% (denominado medio completo) con 100 μ l de una preparación de moléculas Fv multiméricas durante 45 min en hielo. Después de lavar con medio completo, las células se incubaron con 100 μ l del AcM anti-c-myc 9E10 a 10 μ g/ml (IC Chemikalien, Ismaning, Alemania) en el mismo tampón durante 45 min en hielo. Después de un segundo ciclo de lavado, las células se incubaron con 100 μ l de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con FITC (GIBCO BRL) en las mismas condiciones que antes. A continuación, las células se lavaron de nuevo y se resuspendieron en 100 μ l de solución de yoduro de propidio a 1 μ g/ml (Sigma, Deisenhofen, Alemania) en medio completo para excluir las células muertas. La fluorescencia relativa de las células teñidas se midió usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) o sistemas de citómetro de flujo Epics XL (Beckman Coulter, Miami, FL).

20

Los experimentos de citometría de flujo demostraron interacciones específicas tanto con células Jurkat CD3⁺ como con células JOK-1 CD19⁺ para todas las moléculas Fv multiméricas (Figura 11).

25 Para las afinidades de unión a CD19 y CD3 se decidió usar las fracciones correspondientes a los monómeros scFv3 x scFv19 y scFv19 - scFv3 y a los multímeros scFv3 x Db19 y scFv19 x Db3.

Ejemplo 4

*Ensayos *in vitro* de retención en la superficie celular de las moléculas Fv multiméricas*

30 Los ensayos de retención en la superficie celular se realizaron a 37°C, esencialmente como se ha descrito (Adams y col., 1998, Cancer Res. 58, 485-490) excepto porque la detección de los fragmento de anticuerpo retenidos se realizó usando el AcM anti-c-myc 9E10 seguido de un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con FITC. Se dedujeron la constante cinética de disociación (k_d) y la semivida ($t_{1/2}$) para la disociación de moléculas Fv multiméricas a partir de un ajuste de la disminución exponencial monofásica de los datos experimentales usando "GraphPad" Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Como control, se usó el anticuerpo biespecífico CD19 x CD3 (BsDb 19x3) descrito previamente (Kipriyanov y col., 1998, Int. J. Cancer 77, 763-777; Cochlovius y col., 2000, J. Immunol. 165, 888-895). Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 12 y se resumen en la Tabla 1.

40

35 Sobre las células JOK-1 CD19⁺, scFv3 - scFv19 tiene una semivida relativamente corta ($t_{1/2}$) de casi dos veces menos que la $t_{1/2}$ de BsDb 19x3 (Tabla 1). Por el contrario, scFv3 - Db19 se mantenía durante un periodo más largo sobre la superficie de las células JOK-1. Para scFv19 - scFv3 la $t_{1/2}$ está en el mismo intervalo que la $t_{1/2}$ de BsDb 19x3. La retención de scFv3 - scFv19 es significativamente mayor, con una $t_{1/2} = 65,71$ min, en comparación con las otras moléculas (Tabla 1). Las semividas de todas las moléculas Fv multiespecíficas sobre la superficie de células Jurkat CD3⁺ eran relativamente cortas. La longitud del enlazador parecía tener alguna influencia sobre la unión al antígeno, puesto que scFv3 - Db19 y scFv19 - Db3 mostraron una k_d significativamente más lenta a partir de células CD19 positivas que BsDb 19x3, scFv3 x scFv19 y scFv19 - scFv3.

50

55

60

65

ES 2 276 735 T3

TABLA 1

Cinéticas de unión de moléculas recombinantes biespecíficas

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Anticuerpo	Kd (s ⁻¹ /10 ⁻³)	t _{1/2} (min)	Anticuerpo	Kd (s ⁻¹ /10 ⁻³)	t _{1/2} (min)
A. células JOK-1 (CD3⁻/CD19⁺)			B. células JOK-1 (CD3⁻/CD19⁺)		
BsDb 19x3	0,9945	11,62	BsDb 19x3	0,1512	10,68
scFv3- scFv19	1,814	6,368	scFv19- scFv3	0,05547	8,622
scFv3-Db19	0,6563	17,6	scFv19-Db3	0,01171	65,71
C. células Jurkat (CD3⁺/CD19⁻)			D. células Jurkat (CD3⁺/CD19⁻)		
BsDb 19x3	4,268	2,707	BsDb 19x3	4,268	2,707
scFv3- scFv19	2,912	3,967	scFv19- scFv3	6,91	1,672
scFv3-Db19	3,161	3,655	scFv19-Db3	3,4	3,394

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo Fv multimérico, en el que cada monómero del anticuerpo Fv comprende las siguientes caracte-
5 rísticas:

(a) dos dominios variables próximos que forman una unidad scFv V_H-V_L o V_L-V_H de unión al antígeno; estos dos dominios variables primero y segundo se unen mediante un enlazador peptídico de al menos 12 restos de aminoácidos;
10 y

(b) otros dos dominios variables próximos que están unidos no covalentemente a dos dominios variables de otro monómero del anticuerpo Fv, dando lugar a la formación de dos sitios de unión al antígeno adicionales para formar el motivo de multimerización; estos dos dominios variables tercero y cuarto de cada monómero se unen mediante un enlazador peptídico que consiste en un máximo de 10 restos de aminoácidos.
15

2. El anticuerpo Fv multimérico de la reivindicación 1, en el que una característica adicional es que la unidad scFv V_H-V_L o V_L-V_H de unión al antígeno formada por los dos dominios próximos de un monómero se une a los otros dominios variables del motivo de multimerización mediante un enlazador peptídico de al menos 15 restos de aminoácidos.
20

3. El anticuerpo Fv multimérico de la reivindicación 1 ó 2, en el que dichos monómeros comprenden cuatro dominios variables y en el que los dominios variables tercero y cuarto de los monómeros se unen mediante un enlazador peptídico de 5 restos de aminoácidos o menos.
25

4. El anticuerpo Fv multimérico de la reivindicación 3, en el que los dominios tercero y cuarto de los monómeros se unen directamente sin intervención de restos de aminoácidos.

5. El anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que los dominios variables segundo y tercero de los monómeros están unidos mediante un enlazador peptídico que consiste en al menos 20 restos de aminoácidos.
30

6. El anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los dominios variables tercero y/o cuarto de los monómeros se acortan en al menos un resto de aminoácido en sus extremos N y/o C terminales.

7. El anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el orden de los dominios de un monómero es V_H-V_L .
35

8. El anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el orden de los dominios de un monómero es V_L-V_H .
40

9. El anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la unión no covalente de al menos un par de dominios variables se potencia mediante al menos un puente disulfuro.

10. El anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que es un dímero tetravalente, trímero hexavalente o tetrámero octavalente.
45

11. El anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que es un anticuerpo biespecífico o trispecífico o tetraespecífico.

12. El anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que al menos un monómero se une a una sustancia biológicamente activa, un agente químico, un péptido, una proteína o un fármaco.
50

13. El anticuerpo Fv multimético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 ó 12, que es un anticuerpo mono-específico capaz de unirse específicamente al antígeno CD19 de los linfocitos B o al antígeno CEA.
55

14. El anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que es un anticuerpo biespecífico capaz de unirse específicamente a:

- (a) CD19 y al complejo CD3 del receptor de la célula T;
 - (b) CD19 y al complejo CD5 del receptor de la célula T;
 - (c) CD19 y al antígeno CD28 en los linfocitos T;
 - (d) CD19 y CD16 de células destructoras naturales, macrófagos y monocitos activados;
 - (e) CEA y CD3;
- 60
65

ES 2 276 735 T3

(f) CEA y CD28; o

(g) CEA y CD16.

5 15. Un procedimiento para la preparación de un anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que (a) las secuencias de ADN que codifican los enlazadores peptídicos se ligan con las secuencias de ADN que codifican los dominios variables de modo que los enlazadores peptídicos conectan los dominios variables dando lugar a la formación de una secuencia de ADN que codifica un monómero del anticuerpo Fv multimérico multivalente y (b) las secuencias de ADN que codifican los diversos monómeros se expresan en un sistema de expresión
10 adecuado.

16. Una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

15 17. Un vector de expresión que contiene la secuencia de ADN de la reivindicación 16.

18. El vector de expresión de la reivindicación 17, que es pSKK2-scFv_{L18}anti-CD3-LL-scFv_{L10}anti-CD19 también denominado pSKK2-scFv3LL Db19 y depositado como DSM 14470 o pSKK2-scFv_{L18}anti-CD19-LL-scFv_{L10}anti-CD3 también denominado pSKK2-scFv19LL Db3 y depositado como DSM 14471.
20

19. Una célula hospedadora que contiene el vector de expresión de la reivindicación 16 ó 18.

20. Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
25

21. Un anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso como un reactivo de diagnóstico.

22. Uso de un anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para la preparación de una composición farmacéutica para (a) el tratamiento de una enfermedad relacionada con una virus, una bacteria, un tumor o un prión, (b) la aglutinación de células sanguíneas rojas, (c) la unión de células citotóxicas del sistema inmune con células tumorales, o (d) la unión de citocinas activadoras, sustancias citotóxicas o una proteasa a una célula diana.
30

23. Un kit diagnóstico que contiene un anticuerpo Fv multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
35

40

45

50

55

60

65

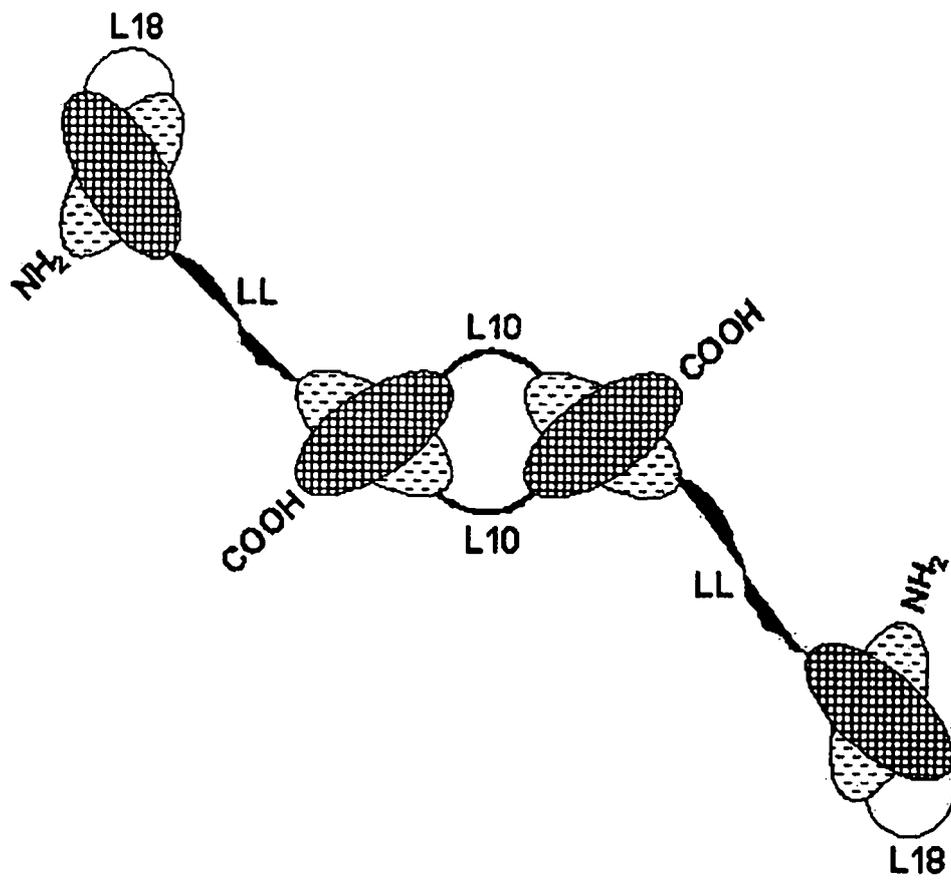


Figura 1

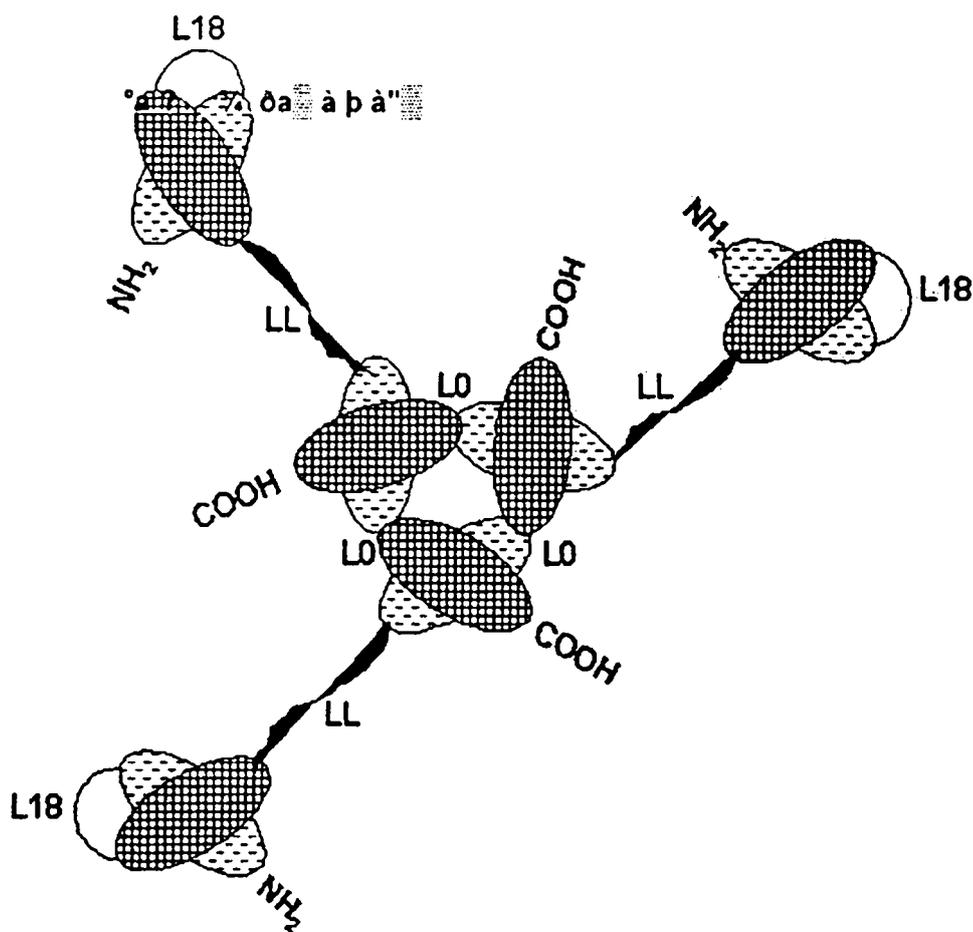


Figura 2

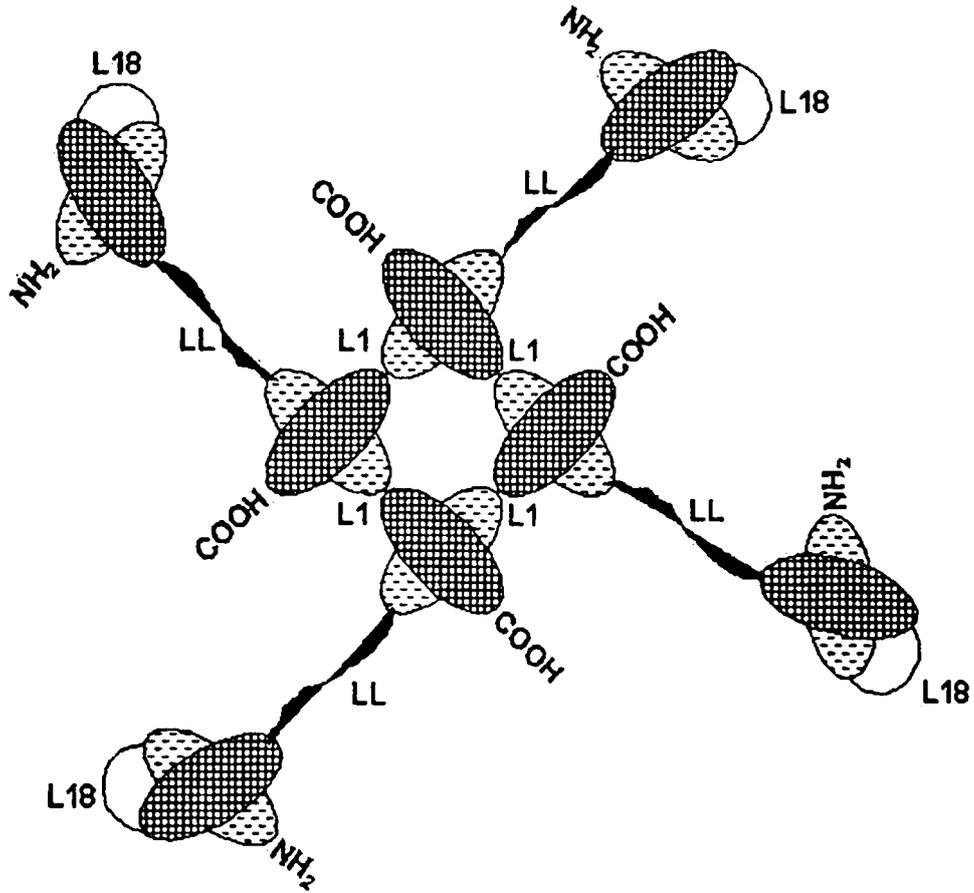


Figura 3

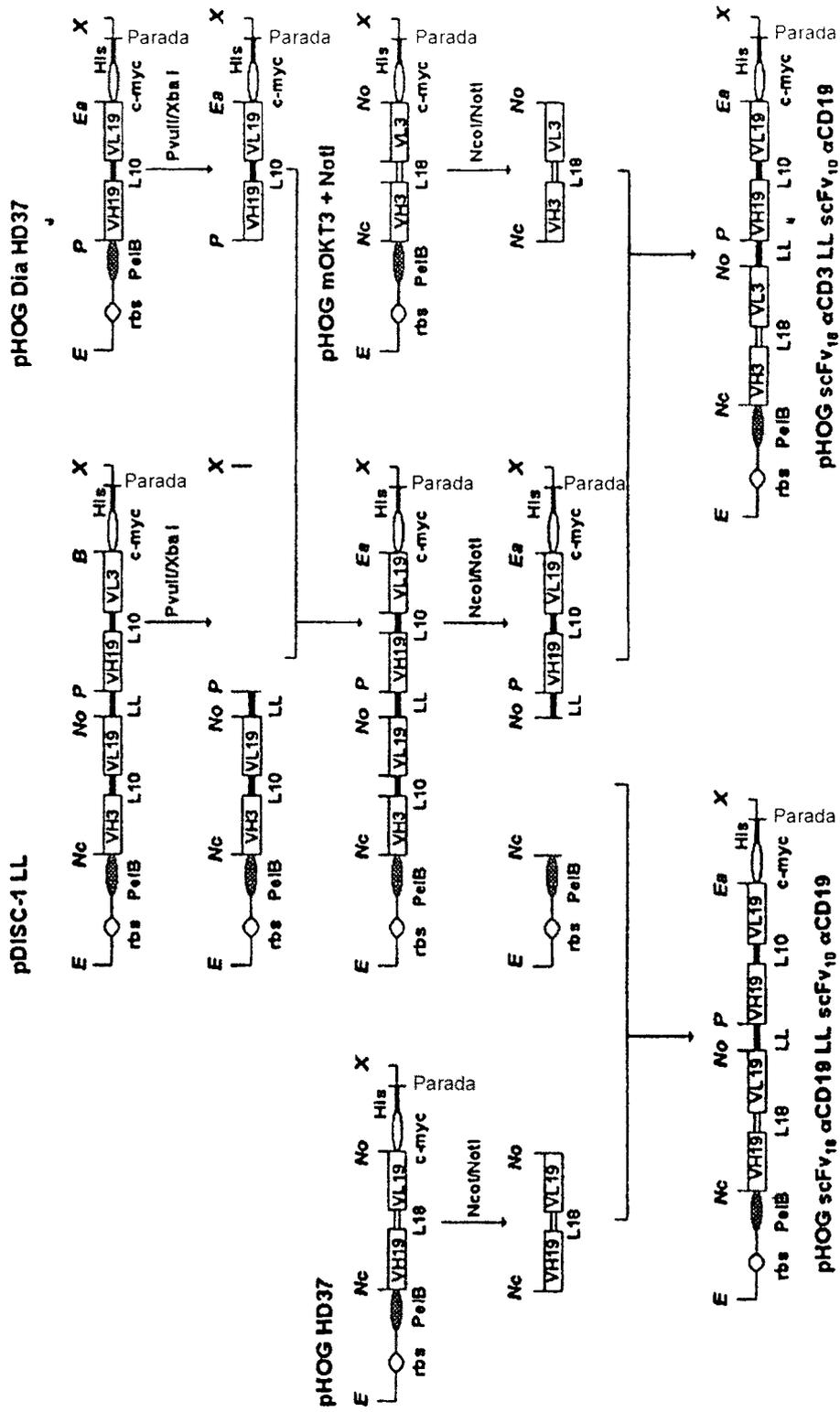


Figura 4

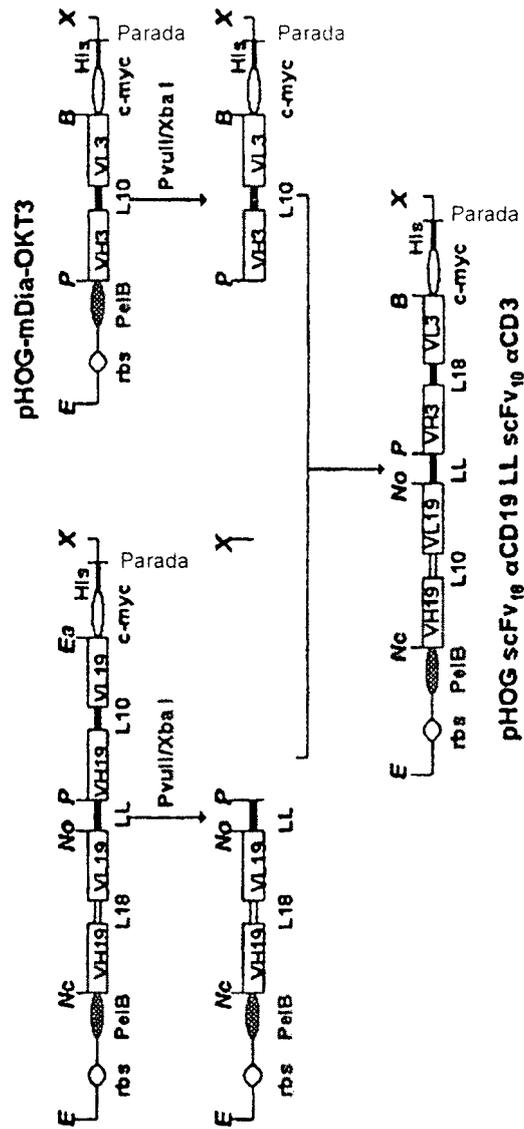


Figura 5

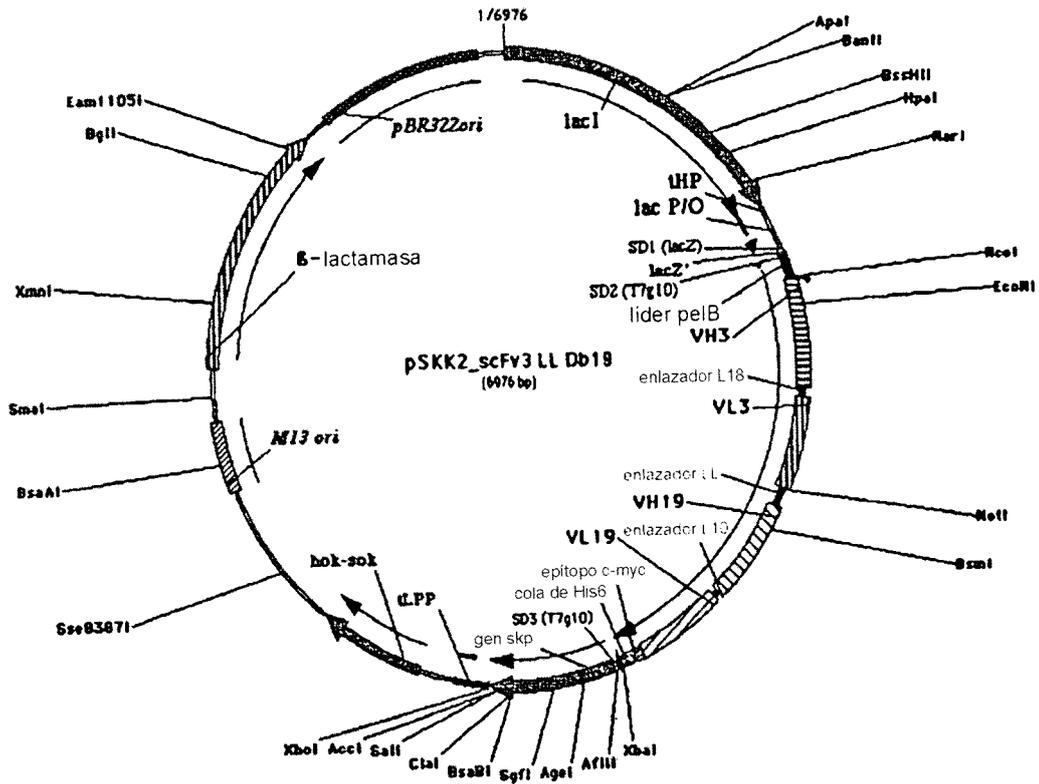


Figura 6

ES 2 276 735 T3

1360 TCTCCTCAGCCAAAACAACCCCAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAACTCCAGCTTCTTTGGGTGTGTCTCTA
>V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L

CDR-L1

1440 GGGCAGAGGGCCACCATCTCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAACTGGTACCAACA

>G Q R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q

CDR-L2

1520 GATTCCAGGAGAGCCACCCAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCCACCCAGGTTTAGTGGCA
> I P G Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G

CDR-L3

1600 GTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTCAGCAAAGT
>S G S G T D F T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S

1680 ACTGAGGATCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAACGGGCTGATGCTTCGGCCGCTGGATCCGAACA
>T E D P W T F G G G T K L E I K R A D A S A A G S E Q

epitopo_c-myc

cola de His6

XbaI

1760 AAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAATCTAGA

> K L I S E E D L N S H H H H H H

Figura 6B

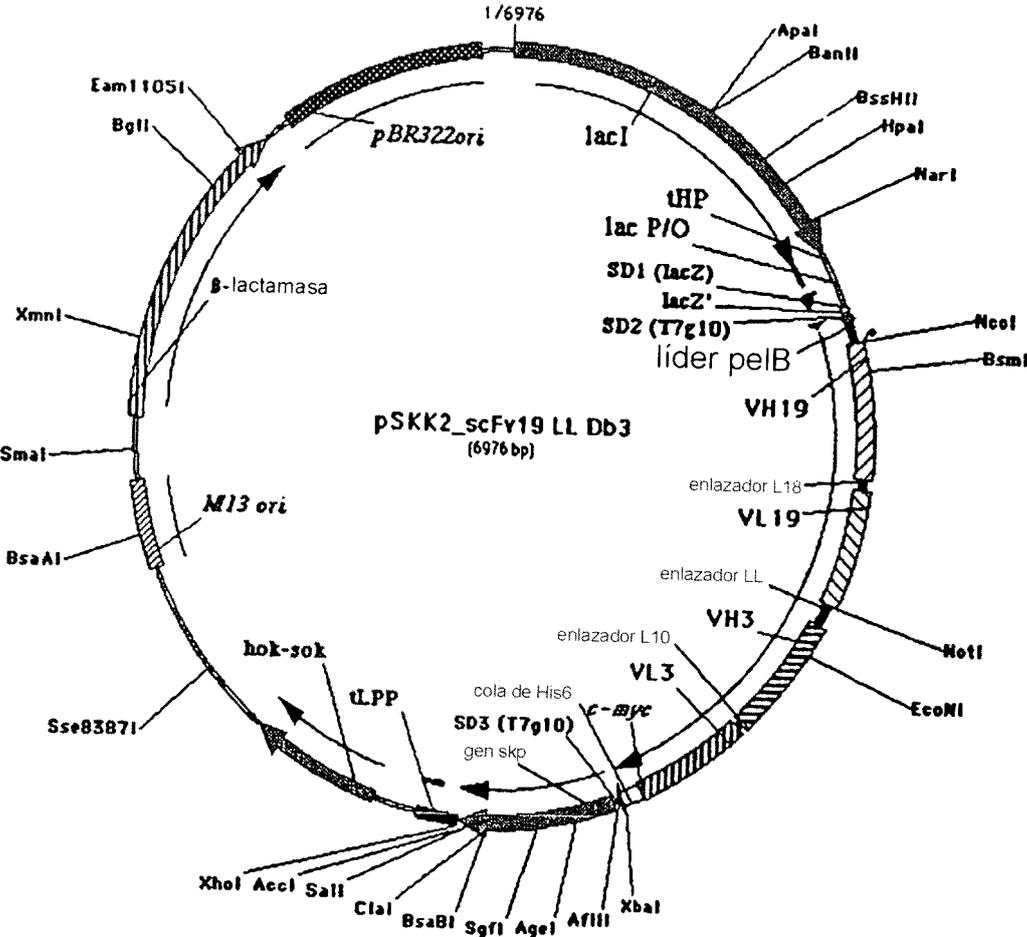


Figura 7

ES 2 276 735 T3

lac P/O SD1 (LacZ)
 1 CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGCAA
lacZ' SD2 (T7g10) lider pelB
 77 ACAGCTATGACCATGATTACGAATTTCTGAAGAAGGAGATATACATATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGC
> M I T N F . > M K Y L L P T A A A
NcoI ↓
 152 TGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGGG
> G L L L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L V R
VH19 BsmI CDR-H1
 228 CCTGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGTGAAGC
> P G S S V K I S C K A S G Y A F S S Y W M N W V K
CDR-H2
 304 AGAGGCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGCCTGGAGATGGTATACTAACTACAATGGAAAGTT
> Q R P G Q G L E W I G Q I W P G D G D T N Y N G K F
 380 CAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGACGAATCCTCCAGCACGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAG
> K G K A T L T A D E S S S T A Y M Q L S S L A S E
CDR-H3
 456 GACTCTGGGTCTATTTCTGTGCAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACTACTGGG
> D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y A M D Y W
enlazador L18
 532 GTC AAGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACCCCAAGCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACC
> G Q G T S V T V S S A K T T P K L E E G E F S E A R
VL19
 608 CGTAGATATCTTGCTCACCCAAACCTCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAG
> V D I L L T Q T P A S L A V S L G Q R A T I S C K
CDR-L1
 684 GCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGACAGCCACCCAAAC
> A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G Q P P K
CDR-L2
 760 TCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGATCCCACCAGGTTTGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTT
> L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F
CDR-L3
 836 CACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTCAGCAAAGTACTGAGGATCCGTGG
> T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W
NotI enlazador LL
 912 ACGTTCCGTTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCCGCCGCTGGTGGTGGTGGTCTGGGCGCG
> T F G G G T K L E I K R A D A A A A G G G G S G G
 988 GTGGTAGCCGTTGGTGGCGGCTCCGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAACTGGCAAG
> G G S G G G S G G G S Q V Q L Q Q S G A E L A R
VH3 EcoNI CDR-H1
 1064 ACCTGGGCCTCAGTGAAGATGCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACTAGGTACAGGATGCACCTGGTAAAA
> P G A S V K M S C K A S G Y T F T R Y T M H W V K
CDR-H2
 1140 CAGAGGCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTTATACTAATTACAATCAGAAGT
> Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y N Q K
 1216 TCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGA
> F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T S E

Figura 7A

ES 2 276 735 T3

1292 GGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACT
> D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T
enlazador L10

1368 CTCACAGTCTGCTCAGCCAAAACAACCCCAAGCTTGGCGGTGATATCGTGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGT
> L T V S S A K T T P K L G G D I V L T Q S P A I M
VL3 CDR-L1

1444 CTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCAGCTCAAGTGAAGTTACATGAACTGGTACCAGCA
> S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M N W Y Q Q
CDR-L2

1520 GAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGG
> K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R

1596 GGCAGTGGTCTGGGACCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATCGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCC
> G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C
CDR-L3

1672 AGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTCCGGCTCGGGACAAAGTTGGAATAAACCGGGCTGATACTGCACCAAC
> Q Q W S S N P F T F G S G T K L E I N R A D T A P T
c-myc cola de His6 XbaI

1748 TGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAATCTAGA
> G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H H

Figura 7B

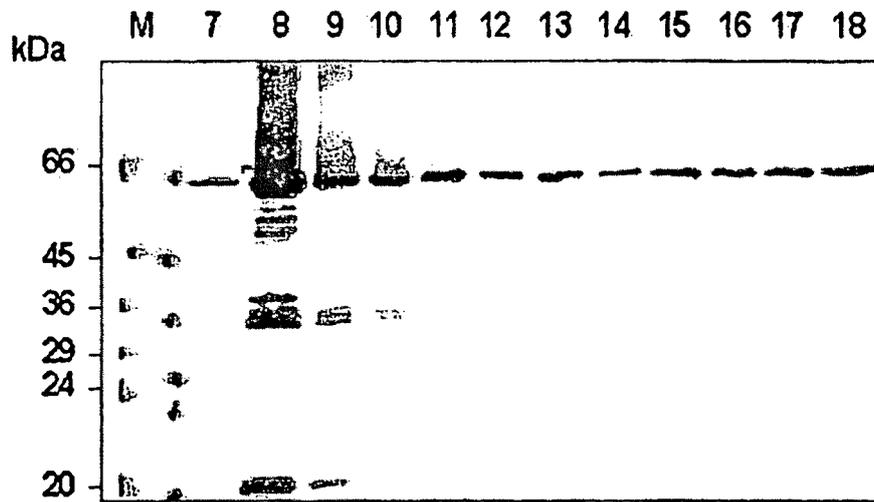


Figura 8A

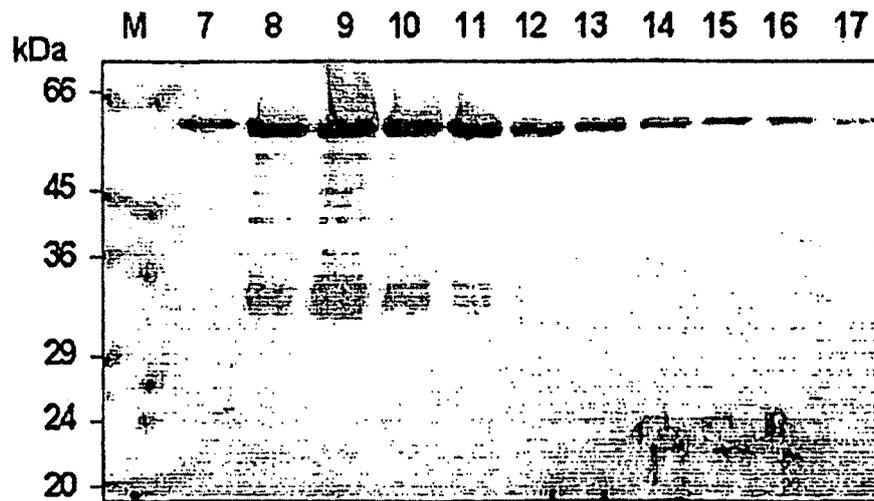


Figura 8B

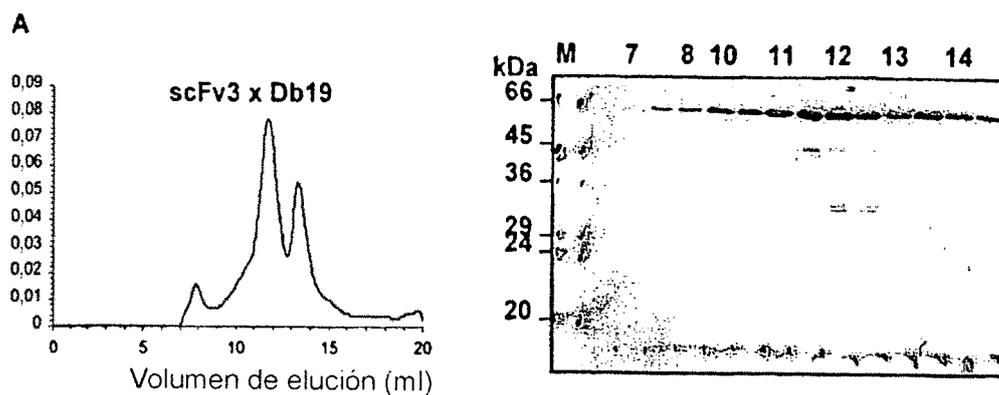


Figura 9A

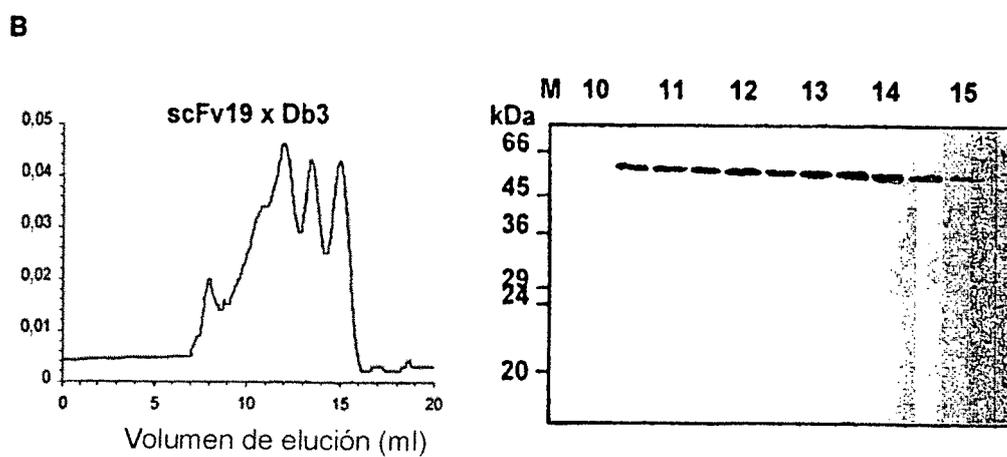


Figura 9B

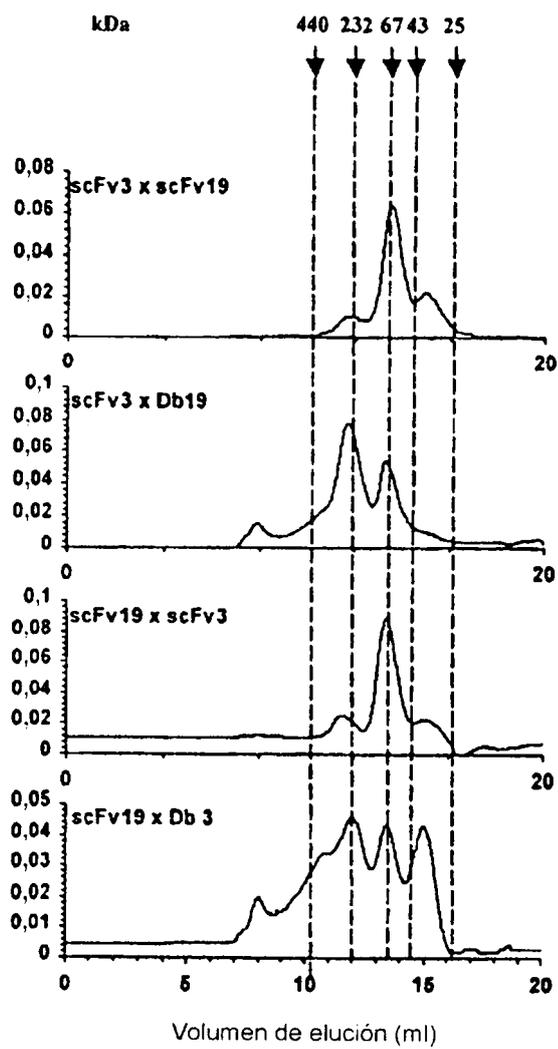
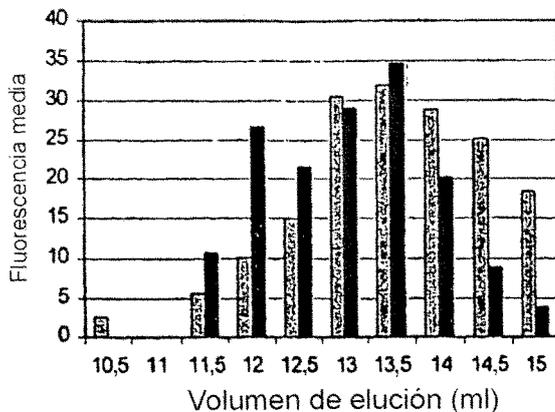
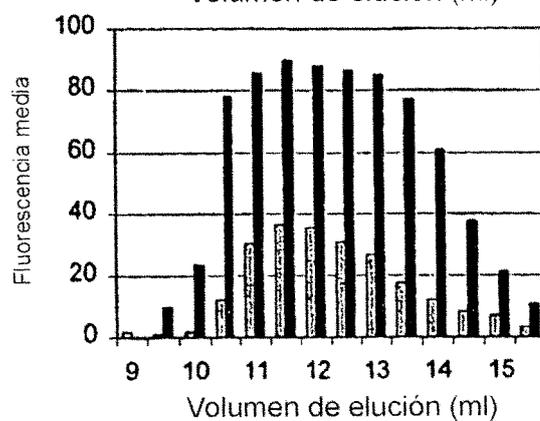


Figura 10

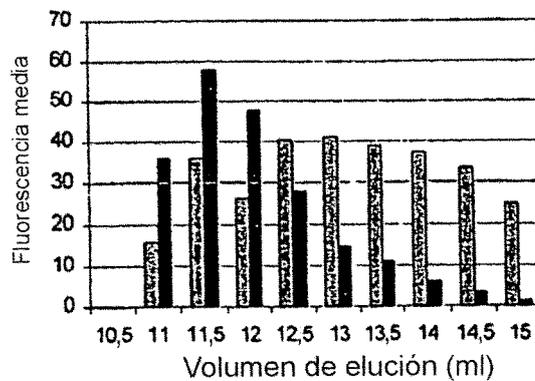
scFv3 x scFv19



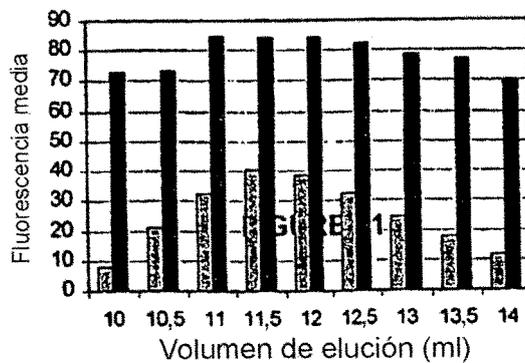
scFv3 x Db19



scFv19 x scFv3



scFv19 x Db3



JOK-1
Jurkat

Figura 11

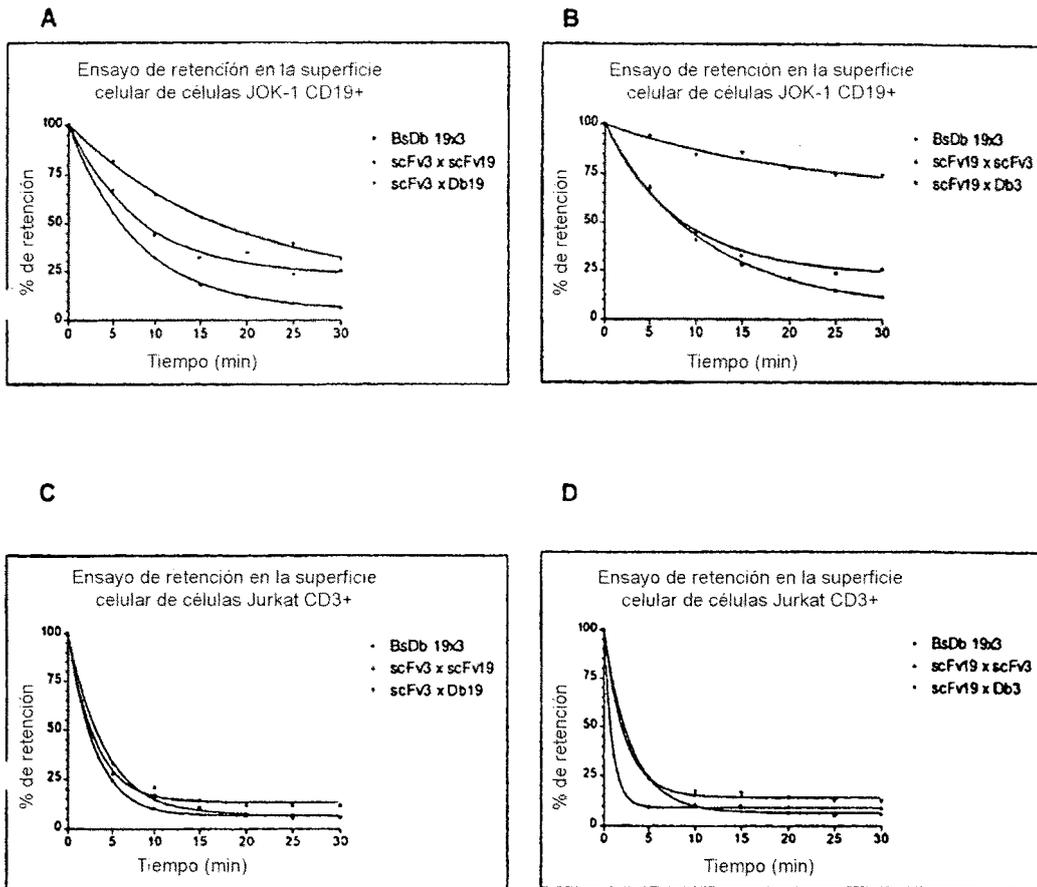


Figura 12