

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3115376

DAL TITOLO:

"ANTICORPO LEGANTE CD3 UMANO"

Depositata il:

** * **

L'invenzione riguarda il campo degli anticorpi, in particolare il campo degli anticorpi terapeutici. Gli anticorpi possono essere utilizzati nel trattamento dell'uomo. Più in particolare l'invenzione riguarda anticorpi e preferibilmente anticorpi bispecifici per il trattamento di un tumore.

Gli anticorpi monoclonali leganti il CD3 umano sono stati tra i primi anticorpi sviluppati per uso terapeutico nell'uomo. Gli anticorpi monoclonali leganti CD3 vengono tipicamente utilizzati per le loro qualità immunosoppressive, per esempio nel rigetto di trapianti. Gli anticorpi che sono bispecifici per CD3 sui linfociti T e per un antigene di superficie bersaglio sulle cellule tumorali sono in grado di connettere qualsiasi tipo di linfocita T ad una cellula tumorale, indipendentemente dalla specificità recettoriale, costimolazione o presentazione del peptide dell'antigene dei linfociti T. Tali anticorpi bispecifici che ingaggiano i linfociti T sono molto promettenti nel trattamento di vari tumori e crescite

neoplastiche.

WO 2014/051433 descrive mAb contro CD3 che sono candidati adatti a fungere da unità costituenti nella generazione di anticorpi bispecifici che agiscono come molecole ingaggianti i linfociti T. Questi mAb contro CD3 vengono indicati come 3056 e 3896; le sequenze VH e VL di questi mAb vengono descritte nella figura 22. Entrambi gli mAb contro CD3 3056 e 3896 hanno buone proprietà in termini di attività funzionale. Essi si legano al CD3/TCR espresso sulla superficie cellulare su linee di linfociti T umani con un'affinità (KD) che è significativamente minore rispetto all'affinità del ben noto anticorpo di topo anti-CD3 mOKT3, portando ad una minore intensità di fluorescenza media nell'analisi di citometria a flusso su cellule CD3^{POS}. In modo simile, quando immobilizzati su piastre per coltura tissutale, essi inducono la proliferazione dei linfociti T ad un grado minore in confronto a mOKT3. Senza essere vincolati alla teoria, si ritiene che sia preferita un'affinità per CD3 che è significativamente minore rispetto all'affinità di mOKT3 in un formato ingaggiante i linfociti T bispecifico. È preferibile che l'anticorpo bispecifico si leghi a CD3 con un'affinità che è minore rispetto all'affinità di legame per l'antigene tumorale. Senza essere vincolati

alla teoria, si ritiene che questa differenza nell'affinità permetta un'opsonizzazione preferenziale delle cellule tumorali da parte dell'anticorpo bispecifico, marcandole quindi per la distruzione da parte delle cellule immunitarie effettrici, compresi linfociti NK e/o T presenti in prossimità.

Gli inventori hanno osservato che i risultati ottenuti con l'anticorpo 3056 hanno mostrato una variazione da lotto a lotto. Ciò ha sorpreso gli inventori, poiché la variabilità non è stata un problema con l'anticorpo 15C3, che ha la stessa sequenza di VH dell'anticorpo 3056, ma una catena leggera differente (descritta in WO 2005/118635).

Un oggetto dell'invenzione è quello di fornire una variante dell'anticorpo 3056 con essenzialmente le stesse proprietà di legame per CD3 in qualità, non necessariamente in quantità, con caratteristiche migliorate.

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

L'invenzione fornisce un anticorpo che si lega al CD3 umano, il quale anticorpo comprende una catena pesante ed una catena leggera in cui la suddetta catena pesante comprende una regione variabile che comprende una sequenza amminoacidica:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI
WYX₁X₂R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTTYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG
YNWFD PWGQG TLVTV SS

con 0-5 sostituzioni amminoacidiche in una o più
posizioni diverse dalla posizione indicata mediante
X₁X₂ e diverse dalle regioni CDR;

in cui

X₁ = N ed X₂ = A;

X₁ = N ed X₂ = T;

X₁ = H ed X₂ = G;

X₁ = D ed X₂ = G; o

X₁ = H ed X₂ = A; e la suddetta catena leggera
comprende la regione variabile della catena leggera
O12/IgV_K1-39 della figura 23A con 0-5 sostituzioni
amminoacidiche.

Viene descritta una molecola di acido nucleico che

codifica una sequenza amminoacidica:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI
WYX₁X₂R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTTYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG
YNWFD PWGQG TLVTV SS

con 0-10, preferibilmente 0-5 inserzioni, delezioni,
sostituzioni, addizioni amminoacidiche, o una loro
combinazione, in una o più posizioni diverse dalla
posizione indicata mediante X₁X₂;

in cui

X₁ = N ed X₂ = A;

X₁ = N ed X₂ = T;

$X_1 = S$ ed $X_2 = G$;

$X_1 = H$ ed $X_2 = G$;

$X_1 = D$ ed $X_2 = G$; o

$X_1 = H$ ed $X_2 = A$.

La combinazione di X_1 ed X_2 in un anticorpo come qui descritto è preferibilmente $X_1 = N$ ed $X_2 = A$.

Viene inoltre descritta una cellula che esprime l'anticorpo e/o comprende la molecola di acido nucleico.

Preferibilmente, a meno che non specificamente specificato altrimenti, un anticorpo dell'invenzione è un anticorpo bispecifico. L'anticorpo bispecifico si lega preferibilmente almeno al CD3 umano. Inoltre, l'anticorpo bispecifico si lega preferibilmente ad almeno una molecola di superficie che è preferibilmente espressa su cellule tumorali umane. In una forma di realizzazione preferita, l'anticorpo bispecifico si lega a BCMA, CD19, CD20, CD30, CD33, CD38, CD44, CD123, CD138, CEA, CLEC12A, CS-1, EGFR, EGFRvIII, EPCAM, DLL3, LGR5, MSLN, FOLR1, FOLR3, HER2, HML.24, MCSP o PSMA. In una forma di realizzazione più preferita, l'anticorpo bispecifico si lega a CLEC12A.

Viene inoltre descritta una composizione farmaceutica comprendente un anticorpo secondo l'invenzione.

Viene inoltre descritto un anticorpo secondo

l'invenzione che comprende inoltre un marcatore, preferibilmente un marcatore per la visualizzazione di immagini in vivo.

Viene inoltre descritto un metodo per il trattamento di un soggetto avente un tumore o a rischio di avere un tumore, comprendente la somministrazione al soggetto di un anticorpo bispecifico secondo l'invenzione. Viene inoltre descritto un anticorpo bispecifico secondo l'invenzione per uso nel trattamento di un soggetto avente un tumore o a rischio di un tumore. Viene inoltre descritto l'uso di un anticorpo dell'invenzione per la preparazione di un medicamento per il trattamento di un soggetto avente un tumore o a rischio di un tumore. In una forma di realizzazione preferita il tumore è un tumore positivo per CLEC12A.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

L'anticorpo dell'invenzione è preferibilmente un anticorpo bispecifico. L'anticorpo bispecifico si lega almeno al CD3 umano. Inoltre, l'anticorpo bispecifico si lega preferibilmente ad almeno una molecola di superficie che viene espressa su cellule tumorali umane. In una forma di realizzazione preferita l'anticorpo bispecifico si lega a BCMA, CD19, CD20, CD30, CD33, CD38, CD44, CD123, CD138, CEA, CLEC12A,

CS-1, EGFR, EGFRvIII, EPCAM, DLL3, LGR5, MSLN, FOLR1, FOLR3, HER2, HML.24, MCSP o PSMA. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, l'anticorpo bispecifico si lega a CLEC12A.

BCMA viene indicato anche come superfamiglia dei recettori del fattore di necrosi tumorale, membro 17 (TNFRSF17); TNFRSF13A2; antigene di maturazione dei linfociti B; BCM; fattore di maturazione dei linfociti B; proteina di maturazione dei linfociti B; antigene CD269 o CD269. Identificativi: HGNC: 11913; Entrez Gene: 608; Ensembl: ENSG00000048462; OMIM: 109545; UniProtKB: Q02223.

CD19 viene indicato anche come molecola CD19; antigene di superficie dei linfociti T Leu-12; antigene CD19; CVID3; antigene di differenziazione CD19; B4; antigene di superficie dei linfociti B B4; antigene dei linfociti B CD19. Identificativi: HGNC: 1633; Entrez Gene: 930; Ensembl: ENSG00000177455; OMIM: 107265; UniProtKB: P15391.

CD20 viene indicato anche come 4 domini transmembrana, sottofamiglia A, membro 1 (MS4A1); MS4A2; CD20; S7; antigene di superficie dei leucociti Leu-16; antigene dei linfociti B CD20; Bp35; antigene di superficie cellulare dei linfociti B B1; antigene CD20; recettore CD20; CVID5; antigene di superficie dei linfociti B

B1; B1; membro 1 della sottofamiglia A a 4 domini transmembrana; LEU-16. Identificativi: HGNC: 7315; Entrez Gene: 931; Ensembl: ENSG00000156738; OMIM: 112210; UniProtKB: P11836.

CD30 viene indicato anche come superfamiglia dei recettori del fattore di necrosi tumorale, membro 8 (TNFRSF8); antigene Ki-1; CD30; Ki-1; D1S166E; recettore citochinico CD30; antigene di attivazione dei linfociti CD30; membro 8 della superfamiglia dei recettori del fattore di necrosi tumorale; CD30L recettore; antigene CD30. Identificativi: HGNC: 11923; Entrez Gene: 943; Ensembl: ENSG00000120949; OMIM: 153243; UniProtKB: P28908.

CD33 viene indicato anche come molecola CD33; SIGLEC-3; antigene CD33 (Gp67); antigene di superficie delle cellule mieloidi CD33; lectina 3 Ig-simile legante l'acido sialico; Siglec-3; SIGLEC3; antigene CD33 e gp67. Identificativi: HGNC: 1659; Entrez Gene: 945; Ensembl: ENSG00000105383; OMIM: 159590; UniProtKB: P20138.

CD38 viene indicato anche come molecola CD38; T10; antigene CD38 (P45); cADPR idrolasi 1; ADP-ribosil ciclasi 1; ADP-ribosil ciclasi/ADP-ribosio ciclico idrolasi; NAD(+) nucleosidasi; EC 3.2.2.5; ADP-ribosio ciclico idrolasi 1; antigene CD38. Identificativi:

HGNC: 1667; Entrez Gene: 952; Ensembl: ENSG00000004468; OMIM: 107270; UniProtKB: P28907.

CD44 viene indicato anche come molecola CD44 (gruppo sanguigno indiano); IN; MDU2; antigene CD44 (funzione di homing e sistema di gruppo sanguigno indiano); MDU3; CDW44; MIC4; CSPG8; proteoglicano con condroitinsolfato 8; HCELL; ligando di E-selectina ed L-selectina delle cellule ematopoietiche; MC56; recettore della matrice extracellulare III; Pgp1; proteoglicano coneparansolfato; Glicoproteina di superficie cellulare CD44; recettore dello ialuronato; epicano; glicoproteina fagocitica 1; funzione di homing e sistema di gruppo sanguigno indiano; ECMR-III; CDw44; HUTCH-I; epicano; LHR; PGP-1; antigene CD44; PGP-I; recettore linfocitario di homing/adesione CP90; glicoproteina fagocitica I; antigene Hermes. Identificativi: HGNC: 1681; Entrez Gene: 960; Ensembl: ENSG00000026508; OMIM: 107269; UniProtKB: P16070.

CD123 viene indicato anche come ciclo di divisione cellulare 123; omologo del ciclo di divisione cellulare 123; C10orf7; omologo della proteina del ciclo di divisione cellulare 123; D123; proteina D123; HT-1080; CCEP123; PZ32; CEP89; omologo del ciclo di divisione cellulare 123 (S. cerevisiae); FLJ14640; fase di lettura aperta 7 del cromosoma 10.

Identificativi: HGNC: 16827; Entrez Gene: 8872;
Ensembl: ENSG00000151465; OMIM: 615470; UniProtKB:
O75794.

CD138 viene indicato anche come sindecano 1 (SCD1);
CD138; SDC; recettore del fattore di crescita dei
fibroblasti, proteoglicano con eparansolfato;
proteoglicano sindecano 1; sindecano; SYND1;
sindecano-1; antigene CD138. Identificativi: HGNC:
10658; Entrez Gene: 6382; Ensembl: ENSG00000115884;
OMIM: 186355; UniProtKB: P18827.

CEA viene indicato anche come molecola di adesione
cellulare 5 correlata all'antigene carcinoembrionario
(CEACAM5); antigene del meconio 100; CD66e; antigene
carcinoembrionario; antigene CD66e. Identificativi:
HGNC: 1817; Entrez Gene: 1048; Ensembl:
ENSG00000105388; OMIM: 114890; UniProtKB: P06731.

CLEC12A viene indicato anche come famiglia 12 del
dominio della lectina di tipo C, membro A; proteina
lectina di tipo C CLL-1; MICL; lectina 2 associata
alle cellule dendritiche; superfamiglia delle lectine
di tipo C; recettore simile alle lectine di tipo C
inibitorio mieloide; molecola simile alle lectine di
tipo C-1; CLL-1; DCAL2; CLL1; molecola simile alle
lectine di tipo C 1; DCAL-2; sottofamiglia L dei
recettori simili alle lectine delle cellule killer,

membro 1 (KLRL1); CD371 (Bakker A. et al. Cancer Res. 2004, 64, pagg. 8843-50; numero di accesso a GenBankTM: AY547296; Zhang W. et al. numero di accesso a GenBankTM: AF247788; A.S. Marshall, et al., J. Biol. Chem. 2004, 279, pagg. 14792-802; numero di accesso a GenBankTM: AY498550; Y. Han et al. Blood 2004, 104, pagg. 2858-66; H. Floyd, et al. numero di accesso a GenBankTM: AY426759; C. H. Chen, et al. Blood 2006, 107, pagg. 1459-67). Identificativi: HGNC: 31713; Entrez Gene: 160364; Ensembl: ENSG00000172322; OMIM: 612088; UniProtKB: Q5QGZ9. CLEC12A è un antigene che è espresso sulle cellule blastiche leucemiche e sulle cellule staminali leucemiche nella leucemia mieloide acuta (LMA), comprese le cellule staminali leucemiche negative per CD34 o esprimenti un basso livello di CD34 (popolazione marginale) (A.B. Bakker et al. Cancer Res. 2004, 64, pagg. 8443-50; Van Rhenen et al. 2007 Blood 110:2659; Moshaver et al. 2008 Stem Cells 26:3059). Altrimenti, si pensa che l'espressione di CLEC12A sia ristretta alla linea ematopoietica, in particolare alle cellule mieloidi nel sangue periferico e nel midollo osseo, cioè granulociti, monociti e precursori delle cellule dendritiche. In maniera più importante, CLEC12A è assente sulle cellule staminali emopoietiche. Questo profilo di

espressione rende CLEC12A un bersaglio particolarmente favorevole nella LMA. La forma a lunghezza intera di CLEC12A comprende 275 residui amminoacidici, compreso un ulteriore tratto intracellulare di 10 amminoacidi che è assente nella maggior parte delle altre isoforme, e mostra un profilo di espressione rigorosamente mieloide (livello di espressione superficiale e di mRNA). Il termine "CLEC12A o suo equivalente funzionale" si riferisce a tutte le varianti (quali di splicing e di mutazione) cui viene fatto riferimento sopra ed alle sue isoforme che mantengono un profilo di espressione rigorosamente mieloide (sia a livello di espressione superficiale che a livello di mRNA) come descritto in Bakker et al. Cancer Res. 2004, 64, pagg. 8443-50 e Marshall 2004 - J. Biol. Chem. 279(15), pagg. 14792-802. Un anticorpo di legame per CLEC12A dell'invenzione si lega al CLEC12A umano. Laddove si faccia qui riferimento a CLEC12A, il riferimento è al CLEC12A umano, a meno che non sia specificamente indicato diversamente.

Il corecettore dei linfociti T CD3 (cluster di differenziazione 3) è un complesso proteico ed è costituito da quattro catene distinte. Nei mammiferi, il complesso contiene una catena CD3 γ , una catena CD3 δ e due catene CD3 ϵ . Queste catene si associano ad una

molecola nota come recettore dei linfociti T (TCR) ed alla catena ζ per generare un segnale di attivazione nei linfociti T. TCR α , TCR β , catena ζ e molecole CD3 insieme costituiscono il complesso TCR. CD3 viene espresso sui linfociti T. Un anticorpo che si lega a CD3 può legare una catena CD3 γ , una catena CD3 δ , una catena CD3 ϵ o una combinazione di CD3 δ /CD3 ϵ o CD3 γ /CD3 ϵ . L'anticorpo di legame per CD3 della presente invenzione si lega alla catena CD3 ϵ . CD3 ϵ è nota sotto vari pseudonimi, alcuni dei quali sono: "molecola CD3e, epsilon (complesso CD3-TCR)"; "antigene CD3e, polipeptide epsilon (complesso TiT3)"; antigene di superficie dei linfociti T T3/Leu-4 catena epsilon; T3E; complesso del recettore dell'antigene dei linfociti T, subunità epsilon di T3; antigene CD3e; CD3-epsilon 3; IMD18; TCRE. Identificativi per il gene CD3E sono HGNC: 1674; Entrez Gene: 916; Ensembl: ENSG00000198851; OMIM: 186830 e UniProtKB: P07766. È stato dimostrato che gli anticorpi leganti CD3 bispecifici che indirizzano a bersaglio la catena CD3 ϵ sono efficaci nel reclutamento dei linfociti T verso cellule aberranti. Quindi, un anticorpo (bispecifico) secondo la presente invenzione contiene preferibilmente una combinazione di catene pesanti/leggere che si lega a CD3 ϵ . Un anticorpo di

legame per CD3 dell'invenzione si lega al CD3 umano. Laddove si faccia qui riferimento a CD3, il riferimento è al CD3 umano, a meno che non sia specificamente indicato diversamente.

CS-1 viene indicato anche come citrato sintasi; EC 2.3.3.1; citrato sintasi, mitocondriale; EC 2.3.3. Identificativi: HGNC: 2422; Entrez Gene: 1431 Ensembl: ENSG0000062485; OMIM: 118950; UniProtKB: O75390.

EGFR viene indicato anche come recettore del fattore di crescita epidermico; omologo dell'oncogene virale della leucemia eritroblastica (V-Erb-B) (aviario); ERBB1; PIG61; proto-oncogene C-ErbB-1; omologo dell'oncogene virale aviario della leucemia eritroblastica (V-Erb-B); tirosin-protein chinasi recettoriale ErbB-1; proteina inibente la crescita cellulare 40; proteina inducente la proliferazione cellulare 61; HER1; mENA; EC 2.7.10.1; EC 2.7.10; recettore del fattore di crescita epidermico (omologo dell'oncogene virale aviario della leucemia eritroblastica (V-Erb-B)). Identificativi: HGNC: 3236; Entrez Gene: 1956; Ensembl: ENSG00000146648; OMIM: 131550; UniProtKB: P00533.

EGFRvIII è una variante comune di EGFR (Oncogene, 23 maggio 2013; 32(21):2670-81. Doi: 10.1038/onc.2012.280. Epub 16 luglio 2012).

Tipo delta 3 (DLL3) viene indicato anche come tipo-delta 3); omologo di delta 3 di Drosophila; delta3; tipo delta (Drosophila) 3; SCD01. Identificativi per DLL3 sono: HGNC: 2909; Entrez Gene: 10683; Ensembl: ENSG00000090932; OMIM: 602768 e UniProtKB: Q9NYJ7.

LGR5 è il recettore 5 accoppiato a proteine G contenente ripetizioni ricche di leucine. Nomi alternativi per il gene o la proteina sono recettore 5 accoppiato a proteine G contenente ripetizioni ricche di leucine; recettore 5 accoppiato a proteine G, contenente ripetizioni ricche di leucine; recettore HG38 accoppiato a proteine G; recettore 49 accoppiato a proteine G; recettore 67 accoppiato a proteine G; GPR67; GPR49; recettore orfano HG38 accoppiato a proteine G; recettore 49 accoppiato a proteine G; GPR49; HG38 e FEX. Una proteina o un anticorpo dell'invenzione che si legano a LGR5, si legano all'LGR5 umano. La proteina o l'anticorpo di legame per LGR5 dell'invenzione, a causa della similarità di sequenza e struttura terziaria tra ortologi umani e di un altro mammifero, possono anche legare un tale ortologo, ma non necessariamente. I numeri di accesso alle banche dati per la proteina LGR5 umana e per il gene che la codifica sono (NC_000012.12; NT_029419.13; NC_018923.2; NP_001264155.1; NP_001264156.1;

NP_003658.1).

MSLN, o mesotelina, viene indicato anche come Mesotelina; fattore potenziante i pre-pro-megacariociti; antigene CAK1; MPF; proteina correlata alla mesotelina MPF solubile; fattore potenziante i megacariociti e SMRP. Identificativi per MSLN sono: HGNC: 7371; Entrez Gene: 10232; Ensembl: ENSG00000102854; OMIM: 601051; UniProtKB: Q13421.

Il recettore del folato 1 viene indicato anche come FOLR1; recettore del folato 1, recettore del folato 1; antigene correlato al tumore ovarico MOv18; proteina legante il folato nell'adulto; recettore del folato, adulto; cellule KB FBP; FR-alfa; FOLR; FBP; proteina legante il folato; e recettore del folato 1. Identificativi per FOLR1 sono HGNC: 3791; Entrez Gene: 2348; Ensembl: ENSG00000110195; OMIM: 136430; UniProtKB: P15328.

Il recettore del folato 3 viene indicato anche come FOLR3; recettore del folato 3 (gamma); FR-gamma; recettore del folato 3; gamma-HFR; ed FR-G. Identificativi per FOLR3 sono HGNC: 3795; Entrez Gene: 2352; Ensembl: ENSG00000110203; OMIM: 602469; ed UniProtKB: P41439.

EPCAM viene indicato anche come molecola di adesione cellulare epiteliale; EGP40; M4S1; ESA; MIC18; KS1/4;

trasduttore del segnale del calcio 1 correlato a tumori; MK-1; TACSTD1; glicoproteina epiteliale umana-2; TROP1; componente di membrana, cromosoma 4, marcatore di superficie (glicoproteina di 35kD); antigene correlato all'adenocarcinoma; EGP; glicoproteina di superficie cellulare Trop-1; Ep-CAM; glicoproteina epiteliale 314; GA733-2; proteina principale correlata a tumori gastrointestinali GA733-2; M1S2; EGP314; antigene CD326; KSA; antigene di superficie delle cellule epiteliali; DIAR5; glicoproteina epiteliale; HNPCC8; hEGP314; antigene identificato mediante l'anticorpo monoclonale AUA1; antigene KS 1/4; EGP-2; ACSTD1. Identificativi: HGNC: 11529; Entrez Gene: 4072; Ensembl: ENSG00000119888; OMIM: 185535; UniProtKB: P16422.

HER2 viene indicato anche come omologo 2 dell'oncogene virale aviario della leucemia eritroblastica V-Erb-B2; ERBB2; CD340; NGL; HER-2; HER-2/neu2; NEU2; TKR1; omologo dell'oncogene derivato da neuro/glioblastoma; proteina C-ErbB2/Neu; proteina del gene 19 del linfonodo metastatico; herstatina; proto-oncogene C-ErbB-2; omologo dell'oncogene derivato da neuroblastoma/glioblastoma; proto-oncogene Neu; tirosin-protein chinasi recettoriale ErbB-2; recettore della superficie cellulare di tipo tirosin chinamico

HER2; omologo 2 dell'oncogene virale della leucemia eritroblastica V-Erb-B2, omologo dell'oncogene derivato da neuro/glioblastoma; MLN 19; MLN19; p185erbB2; antigene CD340; EC 2.7.10.1; EC 2.7.10; omologo 2 dell'oncogene virale aviario della leucemia eritroblastica V-Erb-B2 (omologo dell'oncogene derivato da neuro/glioblastoma). Identificativi: HGNC: 3430; Entrez Gene: 2064; Ensembl: ENSG00000141736; OMIM: 164870; UniProtKB: P04626.

HM1.24 viene indicato anche come BST2; antigene 2 delle cellule stromali del midollo osseo; teterina; BST-2; antigene stromale 2 del midollo osseo; antigene HM1.24; Teterina; CD317; antigene CD317; NPC-A-7. Identificativi: HGNC: 1119; Entrez Gene: 684; Ensembl: ENSG00000130303; OMIM: 600534; UniProtKB: Q10589.

MCSP viene indicato anche come proteina ricca di cisteine correlata ai mitocondri dello sperma (SMCP); MCSP; MCS; selenoproteina della capsula mitocondriale; HSMCSGEN1; proteina ricca di cisteine correlata ai mitocondri spermatici. Identificativi: HGNC: 6962; Entrez Gene: 4184; Ensembl: ENSG00000163206; OMIM: 601148; UniProtKB: P49901.

PSMA viene indicato anche come folato idrolasi (antigene di membrana specifico della prostata) 1; FOLH1; NAALAD1; FOLH; mGCP; glutammato

carbossipeptidasi II; dipeptidasi I acida N-acetilata legata in alfa; PSM; NAALADasi I; PSMA; EC 3.4.17.21; glutammato carbossilasi II; GCP2; proteina del gene 27 inibente la crescita cellulare; NAALADasi; folilpoli-gamma-glutammato carbossipeptidasi; glutammato carbossipeptidasi 2; glutammato carbossipeptidasi di membrana; dipeptidasi acida N-acetilata legata in alfa 1; pteroilpoli-gamma-glutammato carbossipeptidasi; variante F dell'antigene di membrana specifico della prostata; FGCP; folato idrolasi 1; GCPII; antigene di membrana specifico della prostata. Identificativi: HGNC: 3788; Entrez Gene: 2346; Ensembl: ENSG00000086205; OMIM: 600934; UniProtKB: Q04609.

PSMA non deve essere confuso con la subunità del proteasoma (prosome, macropain) di tipo alfa 1 che è anche nota con lo pseudonimo di PSMA1.

I numeri di accesso vengono forniti principalmente per fornire un altro metodo di identificazione di un bersaglio, la sequenza reale della proteina legata può variare, per esempio a causa di una mutazione nel gene codificante, quali quelle che sono presenti in alcuni tumori o simili. Il sito di legame per l'antigene si lega all'antigene e ad una varietà di sue varianti, quali quelle espresse da parte di alcune cellule immunitarie o tumorali positive per l'antigene.

Quando si fa qui riferimento ad un gene e ad una proteina, il riferimento è preferibilmente alla forma umana del gene o della proteina. Quando si fa qui riferimento ad un gene o ad una proteina, si fa riferimento al gene o alla proteina in natura ed a forme varianti del gene o della proteina come si possono rilevare in tumori, cancro e simili, preferibilmente come si possono rilevare in tumori e cancro umani e simili.

Un anticorpo bispecifico dell'invenzione si lega preferibilmente alle proteine umane BCMA, CD19, CD20, CD30, CD33, CD38, CD44, CD123, CD138, CEA, CLEC12A, CS-1, EGFR, EGFRvIII, EPCAM, DLL3, LGR5, MSLN, FOLR1, FOLR3, HER2, HM1.24, MCSP, PSMA o ad una loro variante. Inutile dire che la combinazione di catene pesanti/leggere legante l'antigene si lega preferibilmente alla parte extracellulare dell'antigene. Un anticorpo bispecifico secondo l'invenzione si lega preferibilmente al CLEC12A umano o ad una sua variante. Un anticorpo bispecifico preferito secondo l'invenzione si lega al CD3 umano ed al CLEC12A umano o ad una loro variante.

HGNC sta per comitato di nomenclatura genica dell'HUGO. Il numero che segue l'abbreviazione è il numero di accesso con cui si possono recuperare

informazioni sul gene e sulla proteina codificata dal gene dalla banca dati dell'HGNC. Entrez Gene fornisce il numero di accesso o l'identificativo del gene con cui si possono recuperare informazioni sul gene o sulla proteina codificata dal gene dalla banca dati dell'NCBI (National Center for Biotechnology Information). Ensembl fornisce il numero di accesso con cui si possono ottenere informazioni sul gene o sulla proteina codificata dal gene dalla banca dati di Ensembl. Ensembl è un progetto congiunto tra EMBL-EBI ed il Wellcome Trust Sanger Institute per sviluppare un sistema di programmi che produce e mantiene un'annotazione automatica su genomi eucariotici scelti.

L'invenzione fornisce un anticorpo che si lega al CD3 umano, il quale anticorpo comprende una catena pesante ed una catena leggera in cui la suddetta catena pesante comprende una regione variabile che comprende

la sequenza amminoacidica:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI
WYX₁X₂R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG
YNWFD PWGQG TLVTV SS

con 0-5 sostituzioni amminoacidiche in una o più posizioni diverse dalla posizione indicata mediante X₁X₂ e diverse dalle regioni CDR;

in cui

$X_1 = N$ ed $X_2 = A$;

$X_1 = N$ ed $X_2 = T$;

$X_1 = H$ ed $X_2 = G$;

$X_1 = D$ ed $X_2 = G$; o

$X_1 = H$ ed $X_2 = A$; e la suddetta catena leggera comprende la regione variabile della catena leggera O12/IgVK1-39 della figura 23A con 0-5 sostituzioni amminoacidiche.

Viene inoltre descritta una catena leggera che comprende una regione variabile della catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di un segmento genico O12/IgVk1-39*01, come descritto nella figura 23A, con 0-10, preferibilmente 0-5 inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche o una loro combinazione. L'espressione "catena leggera O12" sarà utilizzata in ogni parte della descrizione come abbreviazione per "una catena leggera comprendente una regione variabile della catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di un segmento genico O12/IgVk1-39*01, come descritto nella figura 23A, con 0-10, preferibilmente 0-5 inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche o una loro combinazione". IgVk1-39 è un'abbreviazione per gene dell'immunoglobulina variabile kappa 1-39. Il gene è noto anche come immunoglobulina kappa variabile

1-39; IGKV139; IGKV1-39; O12a o O12. Identificativi esterni per il gene sono HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Una sequenza amminoacidica preferita per IgVk1-39 è fornita nella figura 23A. Questa elenca la sequenza della regione V. La regione V può essere combinata con una di cinque regioni J. Le figure 23B e 23C descrivono due sequenze preferite per IgVk1-39 in combinazione con una regione J. Le sequenze unite vengono indicate come IGKV1-39/jk1 ed IGKV1-39/jk5; nomi alternativi sono IgVk1-39*01/IGJk1*01 o IgVk1-39*01/IGJk5*01 (nomenclatura secondo la banca dati internet dell'IMGT presso imgt.org).

Si preferisce che la regione variabile della catena leggera comprendente O12/IgVk1-39*01 sia una sequenza della linea germinale. Si preferisce inoltre che la regione variabile della catena leggera comprendente IGJk1*01 o IGJk5*01 sia una sequenza della linea germinale. In una forma di realizzazione preferita, le regioni variabili della catena leggera IGKV1-39/jk1 o IGKV1-39/jk5 sono sequenze della linea germinale.

In una forma di realizzazione preferita, la regione variabile della catena leggera comprende O12/IgVk1-39*01 della linea germinale. In una forma di realizzazione preferita, la regione variabile della

catena leggera comprende le catene leggere kappa IgVk1-39*01/IGJk1*01 o IgVk1-39*01/IGJk5*01. In una forma di realizzazione preferita, una IgVk1-39*01/IGJk1*01. La regione variabile della catena leggera comprende preferibilmente una catena leggera kappa IgVk1-39*01/IGJk1*01 della linea germinale o una catena leggera kappa IgVk1-39*01/IGJk5*01 della linea germinale, preferibilmente una IgVk1-39*01/IGJk1*01 della linea germinale.

I linfociti B maturi che producono un anticorpo con una catena leggera O12 spesso producono una catena leggera che ha subito una o più mutazioni rispetto alla sequenza della linea germinale, cioè rispetto alla sequenza normale nelle cellule non linfoidi dell'organismo. Il procedimento che è responsabile di queste mutazioni viene spesso indicato come (iper)mutazione somatica. La catena leggera risultante viene indicata come catena leggera maturata per affinità. Quando derivate da una sequenza O12 della linea germinale, tali catene leggere sono catene leggere derivate da O12. In questa descrizione, l'espressione "catene leggere O12" includerà le catene leggere derivate da O12. Ovviamente, le mutazioni che vengono introdotte mediante ipermutazione somatica possono anche essere introdotte artificialmente in

laboratorio. In laboratorio possono essere introdotte anche altre mutazioni senza influenzare le proprietà della catena leggera nella qualità, non necessariamente nella quantità. Una catena leggera è almeno una catena leggera O12 se comprende una sequenza come descritta in figura 23A, figura 23B o figura 23C con 0-10, preferibilmente 0-5 inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche o una loro combinazione. In una forma di realizzazione preferita, la catena leggera O12 è una catena leggera comprendente una sequenza come descritta in figura 23A, figura 23B o figura 23C con 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4 inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche o una loro combinazione. In una forma di realizzazione preferita, la catena leggera O12 è una catena leggera comprendente una sequenza come descritta in figura 23A, figura 23B o figura 23C con 0-5, preferibilmente 0-4, più preferibilmente 0-3 inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche o una loro combinazione. In una forma di realizzazione preferita, la catena leggera O12 è una catena leggera comprendente una sequenza come descritta in figura 23A, figura 23B o figura 23C con 0-2, più preferibilmente 0-1, il più preferibilmente 0

inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche o una loro combinazione. In una forma di realizzazione preferita, la catena leggera O12 è una catena leggera comprendente una sequenza come descritta in figura 23A o figura 23B con le citate inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche o una loro combinazione. In una forma di realizzazione preferita, la catena leggera comprende la sequenza della figura 23B.

L'anticorpo è preferibilmente un anticorpo bispecifico. L'anticorpo bispecifico ha preferibilmente una combinazione di regione variabile della catena pesante/regione variabile della catena leggera (VH/VL) che si lega a CD3 ed una seconda combinazione di VH/VL che si lega ad un antigene diverso da un antigene su CD3. In una forma di realizzazione preferita, l'antigene è un antigene tumorale. In una forma di realizzazione preferita, la VL nella suddetta prima combinazione di VH/VL è simile alla VL nella suddetta seconda combinazione di VH/VL. In una forma di realizzazione più preferita, le VL nella prima e nella seconda combinazione di VH/VL sono identiche. In una forma di realizzazione preferita, l'anticorpo bispecifico è un anticorpo a lunghezza intera che ha una combinazione di catene

pesanti/leggere (H/L) che si lega a CD3 ed una combinazione di catene H/L che si lega ad un altro antigene, preferibilmente ad un antigene tumorale. In una forma di realizzazione preferita, la catena leggera nella suddetta prima combinazione di catene H/L è simile alla catena leggera nella suddetta seconda combinazione di catene H/L. In una forma di realizzazione più preferita, le catene leggere nella prima e nella seconda combinazione di catene H/L sono identiche, cioè una catena leggera umana simile o identica è una cosiddetta "catena leggera comune", che è una catena leggera che può combinarsi con differenti catene pesanti per formare anticorpi con domini di legame per antigeni funzionali. In una forma di realizzazione preferita, la catena leggera nella suddetta prima combinazione di catene H/L comprende una regione variabile della catena leggera che è simile alla regione variabile della catena leggera nella suddetta seconda combinazione di catene H/L. In una forma di realizzazione più preferita, le regioni variabili della catena leggera nella prima e nella seconda combinazione di catene H/L sono identiche, cioè una regione variabile della catena leggera umana simile o identica è una cosiddetta "regione variabile della catena leggera comune", che è una regione

variabile della catena leggera che può combinarsi con regioni variabili della catena pesante differenti per formare anticorpi con domini di legame per antigeni funzionali. La catena leggera comprendente una regione variabile della catena leggera comune è preferibilmente una catena leggera comune. La catena leggera comprende preferibilmente una regione variabile della catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di un segmento genico 012/IgVk1-39*01, come descritto nella figura 23A, con 0-5 sostituzioni amminoacidiche, come ulteriormente definito qui altrove. Preferibilmente, la catena leggera comune ha una sequenza della linea germinale. Una sequenza preferita della linea germinale è una regione variabile della catena leggera che viene utilizzata frequentemente nel repertorio umano ed ha buone stabilità termodinamica, resa e solubilità. Una catena leggera della linea germinale preferita è 012, come indicato qui sopra. Una sequenza preferita per 012/IgVk1-39 viene fornita nella figura 23A. Questa elenca la sequenza della regione V. Le figure 23B e 23C descrivono due sequenze preferite per IgVk1-39 in combinazione con una regione J. Le sequenze unite vengono indicate come IGKV1-39/jk1 ed IGKV1-39/jk5; nomi alternativi sono IgVk1-39*01/IGJk1*01 o IgVk1-

39*01/IGJk5*01.

Si preferisce che la regione variabile leggera 012/IgVk1-39*01 sia una sequenza della linea germinale. Si preferisce che la regione variabile della catena leggera comprendente 012/IgVk1-39*01 sia una sequenza della linea germinale. Si preferisce inoltre che la regione variabile della catena leggera comprendente IGJk1*01 o IGJk5*01 sia una sequenza della linea germinale. In una forma di realizzazione preferita, le regioni variabili della catena leggera IGKV1-39/jk1 o IGKV1-39/jk5 sono sequenze della linea germinale. La catena leggera 012 dell'anticorpo bispecifico è preferibilmente una catena leggera 012 come indicato qui sopra.

Un antigene tumorale è definito dal profilo della sua espressione. Un antigene specifico del tumore è tipicamente presente solo sulle cellule di un tumore e non su alcuna altra cellula nell'organismo umano dopo la nascita, preferibilmente adulto. Un antigene associato al tumore è tipicamente presente sulle cellule di un tumore ed anche su alcune cellule normali nell'organismo umano dopo la nascita, preferibilmente adulto. Come qui utilizzato, un antigene tumorale è tipicamente un antigene specifico dei tumori o associato ai tumori. Gli antigeni

tumorali possono essere coinvolti, o meno, nel processo oncogeno. Possono essere differenti, o meno, dalla proteina "normale" negli individui sani. Si osserva che vari antigeni specifici dei tumori sono stati successivamente dimostrati essere espressi anche su alcune altre cellule non oncogene. Antigeni tumorali preferiti sono antigeni tumorali che sono espressi sulla superficie cellulare e che hanno una parte extracellulare. Tipicamente, l'anticorpo si lega ad una parte extracellulare dell'antigene.

Come qui utilizzato, il termine "anticorpo" si riferisce ad una molecola proteica appartenente alla classe proteica delle immunoglobuline, comprendente uno o più domini che si legano ad un epitopo su un antigene, in cui tali domini sono derivati da o condividono un'omologia di sequenza con la regione variabile di un anticorpo. Gli anticorpi sono costituiti tipicamente da unità di base strutturali - ciascuna con due catene pesanti e due catene leggere. Gli anticorpi per uso terapeutico sono preferibilmente il più possibile simili agli anticorpi naturali del soggetto da trattare (per esempio anticorpi umani per soggetti umani). Il legame dell'anticorpo può essere espresso in termini di specificità ed affinità. La specificità determina quali suoi antigene o epitopo

vengono specificamente legati dal dominio di legame. L'affinità è una misura per la forza di legame per un antigene o un epitopo particolari. Il legame, o "riconoscimento specifico", viene definito come legame con affinità (KD) di almeno $1 \times 10^{-6}M$, $1 \times 10^{-7}M$, $1 \times 10^{-8}M$ o almeno $1 \times 10^{-9}M$. Gli anticorpi per applicazioni terapeutiche possono avere affinità di $1 \times 10^{-10}M$ o perfino superiori. Gli anticorpi della presente invenzione sono tipicamente anticorpi bispecifici e della sottoclasse delle IgG umane. Preferibilmente, gli anticorpi della presente invenzione sono della sottoclasse delle IgG1 umane. Il più preferibilmente, gli anticorpi della presente invenzione sono molecole IgG a lunghezza intera. L'invenzione fornisce anche un derivato e/o un analogo di un anticorpo dell'invenzione. Tali derivato e/o analogo hanno i domini VH/VL di un anticorpo dell'invenzione comprendenti preferibilmente la regione variabile della catena leggera comune, come definito qui altrove. Derivati adatti sono frammenti Fv a catena singola, monobody, VHH e frammenti Fab. I derivati possono essere fusi ai domini C_{H2} e C_{H3} di una catena pesante di un anticorpo. Il derivato comprende preferibilmente inoltre il dominio C_{H1} di una catena pesante anticorpale ed il dominio C_L di una catena

leggera anticorpale. Il derivato può anche essere in un formato multivalente, preferibilmente in un formato bispecifico, in cui uno dei domini VH/VL di un anticorpo comprende una combinazione di regione variabile della catena pesante/regione variabile della catena leggera (VH/VL) che si lega a CD3 dell'invenzione ed almeno un altro dominio VH/VL di un anticorpo che si lega ad un antigene che non è un antigene CD3. L'altro dominio VH/VL di un anticorpo si lega preferibilmente ad un antigene tumorale, preferibilmente a CLEC12A. I formati multivalenti vengono facilmente preparati, per esempio, producendo il derivato come proteina di fusione con o senza il gruppo di collegamento o lo spaziatore peptidici adatti e/o convenzionali tra i domini VH/VL.

Un "anticorpo bispecifico" è un anticorpo come descritto qui sopra comprendente una combinazione di regione variabile della catena pesante/regione variabile della catena leggera (VH/VL) che si lega a CD3 ed una seconda combinazione di VH/VL che si lega ad un antigene diverso da CD3, preferibilmente ad un antigene tumorale. In una forma di realizzazione preferita, la VL nella suddetta prima combinazione di VH/VL è simile alla VL nella suddetta seconda

combinazione di VH/VL. In una forma di realizzazione più preferita, le VL nella prima e nella seconda combinazione di VH/VL sono identiche. In una forma di realizzazione preferita, l'anticorpo bispecifico è un anticorpo a lunghezza intera che comprende una combinazione di catene pesanti/leggere che si lega a CD3 ed una combinazione di catene pesanti/leggere che si lega ad un altro antigene, preferibilmente ad un antigene tumorale.

Il legame della combinazione di catene pesanti/leggere per l'antigene viene ottenuto attraverso il sito di legame per l'antigene nella regione variabile della combinazione di catene pesanti/leggere.

L'invenzione fornisce anche formati bispecifici alternativi, come quelli descritti in Spiess, C, et al., (Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol. Immunol. (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.003>).

I formati di anticorpi bispecifici che non sono classici anticorpi con due combinazioni di H/L hanno almeno un dominio variabile comprendente una regione variabile della catena pesante ed una regione variabile della catena leggera dell'invenzione. Questo dominio variabile può essere collegato ad un frammento Fv a

catena singola, un monobody, una VHH ed un frammento Fab che forniscono la seconda attività di legame.

Il termine anticorpo bispecifico può essere sostituito con il termine più ampio "una proteina di legame bispecifica comprendente un dominio variabile immunoglobulinico che si lega a CD3, avente una regione variabile della catena pesante ed una regione variabile della catena leggera dell'invenzione; ed un (poli)peptide di legame per l'antigene che si lega ad un altro antigene". In questa forma di realizzazione, il (poli)peptide di legame è preferibilmente un (poli)peptide come specificato in Spiess et al. (sopra).

In un anticorpo bispecifico dell'invenzione la catena leggera nella combinazione di catene H/L leganti CD3 è preferibilmente simile alla catena leggera nella combinazione di catene H/L che può legare un antigene diverso da CD3, preferibilmente un antigene tumorale. In una forma di realizzazione più preferita, la catena leggera in entrambe le combinazioni di catene H/L è identica, cioè la suddetta catena leggera umana è una cosiddetta "catena leggera comune", che è una catena leggera che può combinarsi con catene pesanti differenti per formare anticorpi con domini di legame per antigeni funzionali. Preferibilmente, la catena

leggera comune ha una sequenza della linea germinale. Una sequenza preferita della linea germinale è una regione variabile della catena leggera che è utilizzata frequentemente nel repertorio umano ed ha buone stabilità termodinamica, resa e solubilità. Una catena leggera della linea germinale preferita è O12, preferibilmente la catena leggera kappa umana della linea germinale riarrangiata IgVk1-39*01/IGJk1*01 o un suo frammento o un suo equivalente funzionale (cioè lo stesso segmento genico di IgVk1-39 ma un differente segmento genico di IGJk) (nomenclatura secondo la banca dati internet dell'IMGT presso imgt.org).

Come utilizzato qui, il termine "catena leggera comune" si riferisce alle due catene leggere (o alla loro parte VL) nell'anticorpo bispecifico. Le due catene leggere (o la loro parte VL) possono essere identiche o avere alcune differenze di sequenza amminoacidica, mentre la specificità di legame dell'anticorpo a lunghezza intera non viene influenzata. Per esempio, è nell'ambito della definizione di catene leggere comuni, come qui utilizzato, preparare o trovare catene leggere che sono non identiche ma comunque funzionalmente equivalenti, per esempio introducendo e testando variazioni amminoacidiche conservative, variazioni

amminoacidiche in regioni che non contribuiscono, o lo fanno solo parzialmente, alla specificità di legame quando appaiate con la catena pesante, e simili. I termini "catena leggera comune", "VL comune", "catena leggera singola", "VL singola", con o senza l'aggiunta del termine "riarrangiata", sono tutti utilizzati qui in modo intercambiabile.

Preferibilmente, la catena leggera comune ha una sequenza della linea germinale. Una sequenza preferita della linea germinale è una regione variabile della catena leggera che è utilizzata frequentemente nel repertorio umano. Una catena leggera della linea germinale preferita è 012, preferibilmente la catena leggera kappa umana della linea germinale riarrangiata IgVk1-39*01/IGJk1*01 o un suo frammento o un suo equivalente funzionale (cioè lo stesso segmento genico di IgVk1-39 ma un differente segmento genico di IGJk) (nomenclatura secondo la banca dati internet dell'IMGT presso imgt.org). I termini catena leggera kappa umana della linea germinale riarrangiata IgVk1-39*01/IGJk1*01, IGKV1-39/IGKJ1, catena leggera huVk1-39 o in breve huVk1-39 vengono utilizzati in modo intercambiabile in ogni parte della domanda. Ovviamente, coloro che sono esperti nell'arte riconosceranno che "comune" si riferisce anche ad

equivalenti funzionali della catena leggera di cui la sequenza amminoacidica non è identica. Esistono molte varianti della suddetta catena leggera in cui sono presenti mutazioni (delezioni, sostituzioni, inserzioni e/o addizioni) che non influenzano materialmente la formazione di regioni di legame funzionale. La catena leggera della presente invenzione può anche essere una catena leggera come specificato qui sopra, avente 0-5 sostituzioni amminoacidiche.

Un anticorpo dell'invenzione è preferibilmente un anticorpo IgG, preferibilmente un anticorpo IgG1. Il termine "IgG a lunghezza intera" secondo l'invenzione viene definito come comprendente una IgG essenzialmente completa, che tuttavia non ha necessariamente tutte le funzioni di una IgG intatta. A scanso di equivoci, una IgG a lunghezza intera comprende due catene pesanti e due leggere. Ciascuna catena contiene regioni costanti (C) e variabili (V), che possono essere scomposte in domini indicati come CH1, CH2, CH3, VH, e CL e VL. Un anticorpo IgG si lega all'antigene attraverso i domini delle regioni variabili contenuti nella porzione Fab, e dopo il legame può interagire con molecole e cellule del sistema immunitario attraverso i domini costanti,

principalmente attraverso la porzione Fc. Gli anticorpi a lunghezza intera secondo l'invenzione comprendono molecole IgG in cui possono essere presenti mutazioni che forniscono le caratteristiche desiderate. La IgG a lunghezza intera non dovrebbe avere delezioni di porzioni sostanziali di alcuna delle regioni. Tuttavia, all'interno del termine "IgG a lunghezza intera" sono comprese molecole IgG in cui vengono eliminati uno o diversi residui amminoacidici, senza essenzialmente alterare le caratteristiche di legame della molecola IgG risultante. Per esempio, tali molecole IgG possono avere una delezione tra 1 e 10 residui amminoacidici, preferibilmente in regioni non CDR, in cui gli amminoacidi eliminati non sono essenziali per la specificità di legame della IgG.

Gli anticorpi IgG a lunghezza intera vengono utilizzati a causa della loro emivita favorevole e per il desiderio di rimanere il più possibile vicini a molecole completamente autologhe (umane) per ragioni di immunogenicità. Sulla base della sua lunga emivita circolatoria nell'uomo, si preferisce la IgG1. Allo scopo di prevenire o evitare l'immunogenicità nell'uomo, si preferisce che l'anticorpo bispecifico IgG a lunghezza intera secondo l'invenzione sia una IgG1 umana. Il termine "bispecifico" significa che una

combinazione di catene pesanti e leggere (combinazione di H/L) o un braccio dell'anticorpo si leghino ad un primo antigene, mentre l'altra combinazione di H/L o l'altro braccio si leghino ad un secondo antigene, in cui i suddetti primo e secondo antigene non sono identici. Un antigene è tipicamente una molecola che funge da bersaglio per un anticorpo. Nella presente invenzione si preferisce che un antigene sia una proteina espressa sulla membrana di una cellula di un individuo. Secondo la presente invenzione, i suddetti primo e secondo antigene sono su due molecole differenti, che sono preferibilmente localizzate su due tipi di cellule differenti. Il termine "un braccio [dell'anticorpo]" si riferisce preferibilmente alla combinazione di catena pesante/catena leggera comprendente una porzione Fab di un anticorpo IgG a lunghezza intera. Gli anticorpi bispecifici che mediano la citotossicità reclutando ed attivando cellule immunitarie endogene sono una classe emergente di sostanze terapeutiche anticorpali di prossima generazione. Questo può essere ottenuto combinando le specificità di legame per l'antigene per le cellule bersaglio (cioè, le cellule tumorali) e le cellule effettrici (cioè, linfociti T, linfociti NK e macrofagi) in una molecola (Cui et al. JBC 2012 (287))

28206 28214; Kontermann, MABS 2012 (4) 182 197; Chames e Baty, MABS 2009 (1) 539 547; Moore et al. Blood 2011 (117) 4542 4551; Loffler et al. 2000 Blood 95:2098; Zeidler et al. 1999 J. Immunol. 163:1246). Secondo l'invenzione, vengono forniti anticorpi bispecifici in cui una combinazione di catene pesanti/leggere si lega all'antigene CLEC12A su cellule aberranti (tumorali), mentre la seconda combinazione di catene pesanti/leggere si lega a CD3 su cellule immunitarie effettrici.

L'invenzione fornisce anticorpi IgG bispecifici in cui una combinazione di catene pesanti/leggere riconosce specificamente CLEC12A o un suo equivalente funzionale, compresi quegli equivalenti funzionali di CLEC12A che sono privi del suddetto ulteriore tratto intracellulare di 10 amminoacidi. Si preferisce un anticorpo IgG bispecifico in cui una combinazione di catene pesanti/leggere si lega alla forma a lunghezza intera di CLEC12A. Inutile dire che la combinazione di catene pesanti/leggere legante l'antigene tumorale si lega alla parte extracellulare dell'antigene tumorale. I termini "dominio della regione variabile", "regione variabile", "dominio variabile", "coppia VH/VL", "VH/VL", "VH", "VL", "porzione Fab", "braccio Fab", "Fab" o "braccio" vengono qui utilizzati in modo

intercambiabile.

Il legame dell'antigene da parte di un anticorpo è tipicamente mediato attraverso le regioni di complementarietà dell'anticorpo e dalla struttura tridimensionale specifica sia dell'antigene che del dominio variabile, permettendo a queste due strutture di legarsi insieme con precisione (un'interazione simile ad una chiave-serratura), anziché attraverso un attaccamento casuale e non specifico degli anticorpi. Poiché tipicamente l'anticorpo riconosce un epitopo di un antigene, e poiché tale epitopo può essere presente anche in altre proteine, gli anticorpi leganti CD3 o CLEC12A secondo la presente invenzione possono riconoscere anche altre proteine, se tali altre proteine contengono lo stesso epitopo. Quindi, il termine "legame" non esclude il legame degli anticorpi con un'altra proteina o con altra/e proteina/e che contengono lo stesso epitopo. Una combinazione di catene pesanti/leggere che si lega a CD3 in un anticorpo dell'invenzione non si lega ad altre proteine sulla membrana di cellule in un essere umano dopo la nascita, preferibilmente adulto. Una combinazione di catene pesanti/leggere dell'invenzione che si lega a CLEC12A non si lega ad altre proteine sulla membrana di cellule in un essere umano dopo la

nascita, preferibilmente adulto.

Un anticorpo bispecifico secondo la presente invenzione si lega a CD3 ed un antigene tumorale si lega a CD3 (preferibilmente a CD3 sulle cellule effettrici) con un'affinità di legame di almeno $1 \times 10^{-6}M$, come descritto in maggior dettaglio sotto. In una forma di realizzazione preferita l'affinità di legame per CD3 è di $1 \times 10^{-6}M-1 \times 10^{-10}M$, preferibilmente di $1 \times 10^{-7}M-1 \times 10^{-9}M$.

Un anticorpo bispecifico secondo la presente invenzione che si lega a CD3 e ad un antigene tumorale si lega all'antigene tumorale preferibilmente con un'affinità di legame che è superiore all'affinità con cui esso si lega a CD3. In una forma di realizzazione preferita, l'affinità del legame dell'antigene tumorale sulle cellule tumorali è almeno 2 volte, più preferibilmente 4 volte, più preferibilmente 6 volte o 10 volte superiore rispetto all'affinità di legame per CD3. In una forma di realizzazione preferita, l'affinità di legame per l'antigene tumorale è di $1 \times 10^{-6}M-1 \times 10^{-10}M$, preferibilmente di $1 \times 10^{-7}M-1 \times 10^{-10}M$, più preferibilmente di almeno 1×10^{-8} , preferibilmente di almeno 1×10^{-9} . Preferibilmente, in combinazione con un'affinità per CD3 che è almeno 2 volte, più preferibilmente 4 volte, più

preferibilmente 6 volte o 10 volte inferiore rispetto all'affinità di legame indicata per l'antigene tumorale. In una forma di realizzazione preferita, l'affinità di legame per l'antigene tumorale è di 1×10^{-8} - 1×10^{-10} .

Il termine "cellule aberranti", come qui utilizzato, comprende cellule tumorali, più specificamente cellule tumorali di origine ematologica comprese anche cellule pre-leucemiche, quali cellule che causano sindromi mielodisplastiche (SMD) e cellule leucemiche quali cellule tumorali della leucemia mieloide acuta (LMA) o cellule della leucemia mieloide cronica (LMC).

I termini "cellula immunitaria effettrice" o "cellula effettrice" come utilizzati qui si riferiscono ad una cellula all'interno del naturale repertorio di cellule nel sistema immunitario dei mammiferi che può essere attivata per influenzare la vitalità di una cellula bersaglio. Le cellule immunitarie effettrici includono cellule della linea linfoide, quali linfociti natural killer (NK), linfociti T, compresi i linfociti T citotossici, o linfociti B, ma anche le cellule della linea mieloide possono essere considerate cellule immunitarie effettrici, quali monociti o macrofagi, cellule dendritiche e granulociti neutrofili. Quindi, la suddetta cellula effettrice è preferibilmente un

linfocita NK, un linfocita T, un linfocita B, un monocita, un macrofago, una cellula dendritica o un granulocita neutrofilo. Secondo l'invenzione, il reclutamento di cellule effettrici verso cellule aberranti significa che le cellule immunitarie effettrici vengono portate in stretta vicinanza con le cellule aberranti bersaglio, in modo tale che le cellule effettrici possano uccidere direttamente o iniziare indirettamente l'uccisione delle cellule aberranti per cui esse vengono reclutate. Si preferisce che un anticorpo legante CD3 si leghi a CD3 sulla superficie delle cellule effettrici.

Un anticorpo che si lega al CD3 umano dell'invenzione comprende una regione variabile della catena pesante

che comprende la sequenza amminoacidica:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI

WYX₁X₂R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG

YNWFD PWGQG TLVTV SS

con 0-5 sostituzioni amminoacidiche in una o più posizioni diverse dalla posizione indicata mediante X₁X₂ e diverse dalle regioni CDR;

in cui

X₁ = N ed X₂ = A;

X₁ = N ed X₂ = T;

X₁ = H ed X₂ = G;

X₁ = D ed X₂ = G; o

$X_1 = H$ ed $X_2 = A$.

La regione variabile della catena pesante può avere 0-5 sostituzioni amminoacidiche rispetto alla sequenza amminoacidica indicata. Le sostituzioni amminoacidiche rispetto alla sequenza indicata, ovviamente, sono solo in posizioni diverse dalle posizioni indicate mediante X_1X_2 e diverse dalle regioni CDR. Nelle posizioni indicate mediante X_1X_2 sono permessi solo gli amminoacidi indicati. In una forma di realizzazione preferita, la regione variabile della catena pesante comprende 0-4, preferibilmente 0-3, preferibilmente 0-2, preferibilmente 0-1 e preferibilmente 0 sostituzioni amminoacidiche rispetto alla sequenza amminoacidica indicata in posizioni diverse dalle posizioni indicate mediante X_1X_2 e diverse dalle regioni CDR. Una combinazione di un'inserzione, un'addizione, una delezione o una sostituzione è una combinazione se le sequenze allineate non differiscono per più di 10, preferibilmente non più di 5 posizioni. Un'interruzione in una delle sequenze allineate vale per tanti amminoacidi quanti saltati nell'altra sequenza.

Preferibilmente, le inserzioni, le delezioni, le sostituzioni, le addizioni amminoacidiche o una loro combinazione non sono nella regione CDR3 della regione

variabile della catena pesante, preferibilmente non nella regione CDR1 e/o CDR2 della regione variabile della catena pesante. In una forma di realizzazione preferita, la regione variabile della catena pesante non comprende una delezione, un'addizione o un'inserzione rispetto alla sequenza indicata. In questa forma di realizzazione, la regione variabile della catena pesante può avere 0-5 sostituzioni amminoacidiche rispetto alla sequenza amminoacidica indicata. Una sostituzione amminoacidica è preferibilmente una sostituzione amminoacidica conservativa.

Un anticorpo che si lega al CD3 umano dell'invenzione comprende una regione variabile della catena pesante

che comprende la sequenza amminoacidica:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI

WYX₁X₂R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG

YNWFD PWGQG TLVTV SS

con 0-5 sostituzioni amminoacidiche in una o più posizioni diverse dalla posizione indicata mediante X₁X₂ e diverse dalle regioni CDR;

in cui

X₁ = N ed X₂ = A;

X₁ = N ed X₂ = T;

X₁ = H ed X₂ = G;

X₁ = D ed X₂ = G; o

$X_1 = H$ ed $X_2 = A$, è preferibilmente un anticorpo comprendente una regione variabile della catena pesante che comprende una sequenza amminoacidica identificata mediante i numeri 5192; 5193; 5196; 5197; 5351; 5354; 5356; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694, come descritto nelle figure 12, 25 e 28. La regione variabile della catena pesante comprende preferibilmente una sequenza amminoacidica identificata mediante i numeri 5196; 5197; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694, come descritto nelle figure 12 e 25. La regione variabile della catena pesante anticorpale comprende preferibilmente una sequenza amminoacidica identificata mediante il numero 5196, come descritto nella figura 12.

L'invenzione fornisce inoltre un anticorpo bispecifico che si lega al CD3 umano dell'invenzione che comprende una catena pesante ed una catena leggera in cui la regione variabile della catena pesante della suddetta

catena pesante comprende la sequenza amminoacidica:
QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI
WYX₁X₂R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG
YNWFD PWGQG TLVTV SS

con 0-5 sostituzioni amminoacidiche in una o più posizioni diverse dalla posizione indicata mediante X_1X_2 e diverse dalle regioni CDR;

in cui

$X_1 = N$ ed $X_2 = A$;

$X_1 = N$ ed $X_2 = T$;

$X_1 = H$ ed $X_2 = G$;

$X_1 = D$ ed $X_2 = G$; o

$X_1 = H$ ed $X_2 = A$.

La catena leggera è una catena leggera comune, come definito qui altrove. L'anticorpo bispecifico comprende inoltre una combinazione di una catena pesante e di una catena leggera che si lega ad un altro antigene, preferibilmente ad un antigene tumorale. La catena leggera della combinazione di una catena pesante e di una catena leggera che si lega ad un altro antigene è preferibilmente una catena leggera comune, come definito qui altrove. La catena pesante che comprende una regione variabile della catena

pesante comprendente la sequenza amminoacidica:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI

WYX₁X₂R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG

YNWFD PWGQG TLVTV SS

con 0-5 sostituzioni amminoacidiche in una o più posizioni diverse dalla posizione indicata mediante X_1X_2 e diverse dalle regioni CDR;

in cui

$X_1 = N$ ed $X_2 = A$;

$X_1 = N$ ed $X_2 = T$;

$X_1 = H$ ed $X_2 = G$;

$X_1 = D$ ed $X_2 = G$; o

$X_1 = H$ ed $X_2 = A$, è preferibilmente una catena pesante che comprende una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica identificata mediante i numeri 5192; 5193; 5196; 5197; 5351; 5354; 5356; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694, come descritto nelle figure 12, 25 e 28. La regione variabile della catena pesante dell'anticorpo bispecifico comprende preferibilmente una sequenza amminoacidica identificata mediante i numeri 5196; 5197; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694, come descritto nelle figure 12 e 25. La regione variabile della catena pesante dell'anticorpo bispecifico comprende preferibilmente la sequenza amminoacidica identificata mediante il numero 5196, come descritto nelle figure 12.

Un anticorpo bispecifico dell'invenzione che comprende una regione variabile della catena pesante che

comprende la sequenza amminoacidica:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI

WYX₁X₂R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG

YNWFD PWGQG TLVTV SS

con 0-5 sostituzioni amminoacidiche in una o più posizioni diverse dalla posizione indicata mediante X_1X_2 e diverse dalle regioni CDR;

in cui

$X_1 = N$ ed $X_2 = A$;

$X_1 = N$ ed $X_2 = T$;

$X_1 = H$ ed $X_2 = G$;

$X_1 = D$ ed $X_2 = G$; o

$X_1 = H$ ed $X_2 = A$

comprende preferibilmente inoltre una combinazione di catene pesanti/leggere che si lega al CLEC12A umano.

In una forma di realizzazione preferita, la catena pesante della combinazione di catene pesanti/leggere che si lega al CLEC12A umano comprende una regione

variabile che comprende la sequenza amminoacidica:

QVQLV QSGAE VKKPG ASVKV SCKAS GYTFT SYMH WVRQA PGQGL EWMGI

INPSG GSTSY AQKFQ GRVTM TRDTS TSTVY MELSS LRSED TAVYY CAKGT

TGDWF DYWCQ GTLVT VSS;

EVQLV QSGAE VKKPG ASVKV SCKAS GYTFT SYMH WVRQA PGQGL EWMGI

INPSG GSTSY AQKFQ GRVTM TRDTS TSTVY MELSS LRSED TAVYY CARGN

YGDEF DYWCQ GTLVT VSS; o

QVQLV QSGAE VKKPG ASVKV SCKAS GYTFT GYMH WVRQA PGQGL EWMGW

INPNS GGTNY AQKFQ GRVTM TRDTS ISTAY MELSR LRSDD TAVYY CARDG

YFADA FDYWG QGTLV TVSS;

con 0-10, preferibilmente 0-5 inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche o una loro combinazione.

La regione variabile della catena pesante della combinazione di catene pesanti/leggere che si lega al CLEC12A umano può avere 0-10, preferibilmente 0-5 inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche rispetto alla sequenza amminoacidica

indicata, o una loro combinazione. In una forma di realizzazione preferita, la regione variabile della catena pesante comprende 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, preferibilmente 0-3, preferibilmente 0-2, preferibilmente 0-1 e preferibilmente 0 inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche rispetto alla sequenza amminoacidica indicata, o una loro combinazione. Una combinazione di un'inserzione, una delezione, un'addizione o una sostituzione è una combinazione come rivendicato se le sequenze allineate non differiscono per più di 5 posizioni. Un'interruzione in una delle sequenze allineate vale per tanti amminoacidi quanti saltati nell'altra sequenza.

Un'inserzione, una delezione, una sostituzione, un'addizione amminoacidiche o una loro combinazione in una regione variabile della catena pesante contro CD3 come qui descritto preferibilmente lasciano immutati H35, A61, Y102, N103 e W104 e le posizioni nella CDR3 di VH. Se viene modificato A50, viene preferibilmente sostituito con S, Y, M o Q. Se viene modificato D59, viene preferibilmente sostituito con Y o E. Tuttavia, è anche possibile la sostituzione di D59 con L, I, V, F, R, A, N, H, S, T. Se viene sostituito A61, viene preferibilmente sostituito con

N, I, H, Q, L, R, Y, E, S, T, D, K, V. Se viene modificato F105, viene preferibilmente sostituito con Y o M. Per la VH contro CD3 dell'invenzione si pensa che i residui H35, Y102, N103 e W104 siano rilevanti per il legame con CD3. Anche altre sostituzioni specifiche nelle posizioni A50, D59, A61 ed F105 sono rilevanti, ma non devono influenzare il legame con CD3. La tabella 2 elenca le sostituzioni amminoacidiche introdotte nella colonna 2. Quelle che sono anche state recuperate vengono menzionate nella colonna 3. Le sostituzioni amminoacidiche che sono state introdotte ma non recuperate sono ritenute influenzare l'anticorpo e non sono desiderate. Per esempio, una mutazione A50I non è desiderata. Si possono trovare facilmente le sostituzioni amminoacidiche tollerate utilizzando il metodo descritto nell'esempio 5A insieme a CIEX-HPLC dopo la conservazione.

Preferibilmente, un'inserzione, una delezione, una sostituzione, un'addizione amminoacidiche o una loro combinazione non vengono realizzate nell'interfase di legame della catena pesante e leggera.

Se viene cambiato un amminoacido nell'interfase dell'interazione delle catene H/L, si preferisce che i corrispondenti amminoacidi nell'altra catena vengano

cambiati per permettere il cambiamento. Preferibilmente, un'inserzione o un'addizione di un amminoacido non comportano l'inserzione o l'addizione di una prolina.

In linea di principio, un'addizione di un amminoacido può essere considerata essere uguale ad un'inserzione.

L'addizione di un amminoacido ad una delle estremità di una catena polipeptidica talvolta non è considerata un'inserzione, ma come rigorosa addizione (prolungamento). Per la presente invenzione, sia un'addizione all'interno di una catena che ad una delle estremità sono considerate essere un'inserzione.

Preferibilmente, inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche o una loro combinazione non sono nella regione CDR3 della regione variabile della catena pesante, preferibilmente non nelle regioni CDR1 o CDR2 della regione variabile della catena pesante.

In una forma di realizzazione preferita, la regione variabile della catena pesante non comprende una delezione, un'addizione o un'inserzione rispetto alla sequenza indicata. In questa forma di realizzazione, la regione variabile della catena pesante può avere 0-5 sostituzioni amminoacidiche rispetto alla sequenza amminoacidica indicata. Una sostituzione amminoacidica è preferibilmente una sostituzione amminoacidica

conservativa. Preferibilmente, CDR1, CDR2 e CDR3 di una VH legante CD3 dell'invenzione comprendono rispettivamente la sequenza amminoacidica GFTFSSYG per CDR1 (secondo IMGT), IWYNARKQ per CDR2 e GTGYNWFDP per CDR3. Preferibilmente, CDR1, CDR2 e CDR3 di una VH di legame con CLEC12A dell'invenzione comprendono rispettivamente le sequenze amminoacidiche GYTFTSYY per CDR1, INPSGGST per CDR2 e GTTGDWFDY per CDR3.

La regione variabile della catena leggera comprende preferibilmente un segmento V della regione variabile O12 della linea germinale. In una forma di realizzazione preferita, la regione variabile della catena leggera comprende il segmento V della catena leggera kappa IgVk1-39*01. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, la regione variabile della catena leggera comprende la catena leggera kappa IgVk1-39*01/IGJk1*01 o IgVk1-39*01/IGJk1*05. In una forma di realizzazione più preferita, la regione variabile della catena leggera comprende una sequenza della catena leggera kappa IgVk1-39*01/IGJk1*01 della linea germinale.

In un anticorpo bispecifico dell'invenzione si preferisce che la catena leggera sia uguale per entrambe le combinazioni di catena pesante/catena leggera. Una tale catena leggera viene indicata anche

come "catena leggera comune". Il termine "catena leggera comune" secondo l'invenzione si riferisce a catene leggere che possono essere identiche o che hanno alcune differenze di sequenza amminoacidica pur mantenendo la specificità di legame dell'anticorpo. Nell'ambito della definizione di catene leggere comuni, come qui utilizzato, è possibile per esempio preparare o trovare catene leggere che sono non identiche ma comunque funzionalmente equivalenti, per esempio introducendo e testando variazioni amminoacidiche conservative, variazioni amminoacidiche in regioni che non contribuiscono, o lo fanno solo parzialmente, alla specificità di legame quando appaiate con la catena pesante, e simili. I termini "catena leggera comune", "VL comune", "catena leggera singola", "VL singola", con o senza l'aggiunta del termine "riarrangiata", sono qui tutti utilizzati in modo intercambiabile. È un aspetto della presente invenzione quello di utilizzare come catena leggera comune una catena leggera umana che può combinarsi con catene pesanti differenti per formare anticorpi con domini di legame per antigeni funzionali (WO 2004/009618, WO 2009/157771, Merchant et al. 1998, Nissim et al. 1994). Preferibilmente, la catena leggera comune ha una sequenza della linea germinale.

Una sequenza preferita della linea germinale è una regione variabile della catena leggera che è utilizzata frequentemente nel repertorio umano ed ha una capacità superiore di appaiarsi con molte regioni VH differenti, ed ha buone stabilità termodinamica, resa e solubilità.

In una forma di realizzazione preferita, la catena leggera comune comprende una regione variabile della catena leggera che comprende O12/IgVk1-39*01 della linea germinale. In una forma di realizzazione preferita, la regione variabile della catena leggera comprende la catena leggera kappa IgVk1-39*01/IGJk1*01 o IgVk1-39*01/IGJk5*01. In una forma di realizzazione preferita, una IgVk1-39*01/IGJk1*01. La regione variabile della catena leggera comprende preferibilmente una catena leggera kappa IgVk1-39*01/IGJk1*01 della linea germinale o una catena leggera kappa IgVk1-39*01/IGJk5*01 della linea germinale. In una forma di realizzazione preferita una IgVk1-39*01/IGJk1*01 della linea germinale. Ovviamente, coloro che sono esperti nell'arte riconosceranno che "comune" si riferisce anche ad equivalenti funzionali della catena leggera di cui la sequenza amminoacidica non è identica. Esistono molte varianti della suddetta catena leggera in cui sono

presenti mutazioni (delezioni, sostituzioni, addizioni) che non influenzano materialmente la formazione delle regioni di legame funzionale.

In una forma di realizzazione preferita, la regione variabile della catena leggera comprende la sequenza amminoacidica DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK o DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK con 0-5 sostituzioni amminoacidiche. In una forma di realizzazione preferita, la regione variabile della catena leggera comprende 0-4, preferibilmente 0-3, preferibilmente 0-2, preferibilmente 0-1 e preferibilmente 0 sostituzioni amminoacidiche rispetto alla sequenza amminoacidica indicata. Una combinazione di un'inserzione, una delezione, un'addizione o una sostituzione è una combinazione come rivendicato se le sequenze allineate non differiscono per più di 5 posizioni. Un'interruzione in una delle sequenze allineate vale per tanti amminoacidi quanti saltati nell'altra sequenza. In una forma di realizzazione preferita, la regione variabile della catena leggera comprende la sequenza amminoacidica DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS

RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE
IK o DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP
GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT
YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK. In una forma di
realizzazione preferita, la regione variabile della
catena leggera comprende la sequenza amminoacidica
DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK
LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ
SYSTP PTFGQ GTKVE IK. In un'altra forma di
realizzazione preferita la regione variabile della
catena leggera comprende la sequenza amminoacidica
DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK
LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ
SYSTP PITFG QGTRL EIK.

Preferibilmente, inserzioni, delezioni, sostituzioni,
addizioni amminoacidiche o una loro combinazione non
sono nella regione CDR3 della regione variabile della
catena leggera, preferibilmente non nelle regioni CDR1
o CDR2 della regione variabile della catena pesante.
In una forma di realizzazione preferita, la regione
variabile della catena pesante non comprende una
delezione, un'addizione o un'inserzione rispetto alla
sequenza indicata. In questa forma di realizzazione,
la regione variabile della catena pesante può avere 0-
5 sostituzioni amminoacidiche rispetto alla sequenza

amminoacidica indicata. Una sostituzione amminoacidica è preferibilmente una sostituzione amminoacidica conservativa. Preferibilmente, CDR1, CDR2 e CDR3 di una catena leggera di un anticorpo dell'invenzione comprendono rispettivamente la sequenza amminoacidica CDR1 - QSISSY, CDR2 - AAS, CDR3 - QQSYSTP, cioè le CDR di IGKV1-39 (secondo IMGT).

Come citato qui sopra, è preferibile che l'anticorpo dell'invenzione sia un anticorpo bispecifico. In una forma di realizzazione preferita, l'anticorpo bispecifico comprende una combinazione di catene pesanti/leggere legante CD3 come qui indicato, ed una combinazione di catene pesanti/leggere che si lega ad un antigene tumorale. In una forma di realizzazione preferita, la combinazione di catene pesanti/leggere legante l'antigene tumorale si lega a CLEC12A.

La regione costante di un anticorpo (bispecifico) della presente invenzione è preferibilmente una regione costante umana. La regione costante può contenere una o più, preferibilmente non più di 10, preferibilmente non più di 5 differenze amminoacidiche rispetto alla regione costante di un anticorpo umano presente in natura. Vari domini variabili di anticorpi prodotti qui sono derivati da una libreria di domini anticorpali variabili umani. Pertanto, questi domini

variabili sono umani. Le regioni CDR uniche possono essere derivate dall'uomo, essere sintetiche o derivate da un altro organismo. Un anticorpo o un anticorpo bispecifico dell'invenzione sono preferibilmente un anticorpo umano o umanizzato.

Nell'arte esistono vari metodi per produrre gli anticorpi. Gli anticorpi vengono tipicamente prodotti da una cellula che esprime l'acido nucleico codificante l'anticorpo. Cellule adatte alla produzione di anticorpi sono una cellula di ibridoma, una cellula di ovaio di criceto cinese (CHO), una cellula NSO o una cellula PER.C6. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, la suddetta cellula è una cellula CHO.

Varie istituzioni ed aziende hanno sviluppato linee cellulari per la produzione di anticorpi su larga scala, per esempio per uso clinico. Esempi non limitanti di tali linee cellulari sono cellule CHO, cellule NSO o cellule PER.C6. Queste cellule sono utilizzate anche per altri scopi, quali la produzione di proteine. Le linee cellulari sviluppate per produzione su scala industriale di proteine ed anticorpi sono qui inoltre indicate come linee cellulari industriali. Viene inoltre descritta una linea cellulare industriale che produce un anticorpo

dell'invenzione.

Viene inoltre descritta una cellula comprendente un anticorpo secondo l'invenzione e/o un acido nucleico come qui descritto. La suddetta cellula è preferibilmente una cellula animale, più preferibilmente una cellula di mammifero, più preferibilmente una cellula di primate, il più preferibilmente una cellula umana. Per gli scopi qui presenti, una cellula adatta è qualsiasi cellula in grado di comprendere e preferibilmente di produrre un anticorpo secondo l'invenzione e/o un acido nucleico come descritto.

Viene inoltre descritta una cellula comprendente un anticorpo secondo l'invenzione. Preferibilmente, la suddetta cellula (tipicamente una cellula in vitro, isolata o ricombinante) produce il suddetto anticorpo. In una forma di realizzazione preferita, la suddetta cellula è una cellula di ibridoma, una cellula di ovaio di criceto cinese (CHO), una cellula NSO o una cellula PER.C6. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, la suddetta cellula è una cellula CHO. Viene inoltre fornita una coltura cellulare comprendente una cellula secondo quanto descritto. Varie istituzioni ed aziende hanno sviluppato linee cellulari per la produzione di

anticorpi su larga scala, per esempio per uso clinico. Esempi non limitanti di tali linee cellulari sono cellule CHO, cellule NSO o cellule PER.C6. Queste cellule sono utilizzate anche per altri scopi, quali la produzione di proteine. Le linee cellulari sviluppate per la produzione su scala industriale di proteine ed anticorpi vengono inoltre qui indicate come linee cellulari industriali. Così, viene anche descritto l'uso di una linea cellulare sviluppata per la produzione su larga scala di un anticorpo per la produzione di un anticorpo dell'invenzione. Viene inoltre descritta una cellula per produrre un anticorpo comprendente una molecola di acido nucleico che codifica una VH, una VL e/o una catena pesante e leggera di un anticorpo come rivendicato. Preferibilmente, la suddetta molecola di acido nucleico codifica una VH identificata mediante il numero 5196 della figura 12, una molecola di acido nucleico codificante una VH come identificata mediante il numero 4327 della figura 24 o una loro combinazione.

Viene inoltre descritto un metodo per produrre un anticorpo comprendente il sottoporre a coltura una cellula come descritta qui e la raccolta del suddetto anticorpo dalla suddetta coltura. Preferibilmente, la

suddetta cellula viene sottoposta a coltura in un terreno privo di siero. Preferibilmente, la suddetta cellula è adatta alla crescita in sospensione. Viene inoltre descritto un anticorpo che può essere ottenuto mediante un metodo per produrre un anticorpo secondo l'invenzione. L'anticorpo viene preferibilmente purificato dal terreno della coltura. Preferibilmente, il suddetto anticorpo viene purificato per affinità.

Una cellula come descritta è, per esempio, una linea cellulare di ibridoma, una cellula CHO, una cellula 293F, una cellula NSO o un altro tipo cellulare noto per la sua adeguatezza per la produzione di anticorpi per scopi clinici. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, la suddetta cellula è una cellula umana. Preferibilmente, una cellula che viene trasformata mediante una regione E1 adenovirale o un suo equivalente funzionale. Un esempio preferito di una tale linea cellulare è la linea cellulare PER.C6 o un suo equivalente. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, la suddetta cellula è una cellula CHO o una sua variante. Preferibilmente, una variante che utilizza un sistema vettoriale della glutammina sintetasi (GS) per l'espressione di un anticorpo.

Viene inoltre descritto un metodo per produrre un

anticorpo comprendente il sottoporre a coltura una cellula come descritto e la raccolta del suddetto anticorpo dalla suddetta coltura. Preferibilmente, la suddetta cellula viene sottoposta a coltura in un terreno privo di siero. Preferibilmente, la suddetta cellula è adatta alla crescita in sospensione. Viene inoltre descritto un anticorpo che può essere ottenuto mediante un metodo per produrre un anticorpo secondo l'invenzione. L'anticorpo viene preferibilmente purificato dal terreno della coltura. Preferibilmente, il suddetto anticorpo viene purificato per affinità.

Gli anticorpi bispecifici vengono tipicamente prodotti anche da parte di cellule che esprimono l'acido nucleico codificante l'anticorpo. In questo caso la cellula esprime le differenti catene leggere e pesanti che costituiscono l'anticorpo bispecifico. A questo scopo, la cellula esprime due catene pesanti differenti ed almeno una catena leggera. Poiché le catene pesanti immodificate possono appaiarsi l'una con l'altra per formare dimeri, tipicamente tali cellule producono i due anticorpi monoclonali (omodimeri) oltre all'anticorpo bispecifico (eterodimero). Il numero di possibili combinazioni di catene pesanti/leggere negli anticorpi prodotti aumenta quando la cellula esprime due o più catene

leggere. Per ridurre il numero di specie anticorpali differenti prodotte (combinazioni di differenti catene pesanti e leggere) si preferisce la suddetta "catena leggera comune".

Una cellula che produce anticorpi che esprime una catena leggera comune e quantità uguali delle due catene pesanti produce tipicamente il 50% di anticorpo bispecifico ed il 25% di ciascuno degli anticorpi monospecifici (cioè aventi identiche combinazioni di catene pesanti e leggere). Sono stati pubblicati diversi metodi per favorire la produzione dell'anticorpo bispecifico o, viceversa, degli anticorpi monospecifici. Nella presente invenzione si preferisce che la cellula favorisca la produzione dell'anticorpo bispecifico rispetto alla produzione dei rispettivi anticorpi monospecifici. Ciò viene tipicamente ottenuto modificando la regione costante delle catene pesanti, in modo tale che esse favoriscano l'eterodimerizzazione (cioè la dimerizzazione con la catena pesante dell'altra combinazione di catene pesanti/leggere) rispetto all'omodimerizzazione. In una forma di realizzazione preferita, l'anticorpo bispecifico dell'invenzione comprende due differenti catene pesanti immunoglobuliniche con domini di eterodimerizzazione

compatibili. Nell'arte sono stati descritti vari domini di eterodimerizzazione compatibili (si veda per esempio Gunasekaran et al. JBC 2010 (285) 19637-19646). I domini di eterodimerizzazione compatibili sono preferibilmente domini di eterodimerizzazione CH3 della catena pesante immunoglobulinica compatibili. L'arte descrive vari modi in cui si può ottenere tale eterodimerizzazione delle catene pesanti. Un modo è quello di generare anticorpi bispecifici "sporgenza in cavità". Si veda la domanda di brevetto US 20030078385 (Arathoon et al. - Genentech).

In US 9,248,181, US 9,358,286 e PCT/NL2013/050294 (pubblicata come WO 2013/157954) vengono descritti metodi e mezzi per produrre anticorpi bispecifici utilizzando domini di eterodimerizzazione compatibili. Questi mezzi e metodi possono anche essere impiegati in modo favorevole nella presente invenzione. Specificamente, le mutazioni preferite per produrre essenzialmente solo molecole IgG bispecifiche a lunghezza intera sono le sostituzioni amminoacidiche L351K e T366K (numerazione secondo Kabat) nel primo dominio CH3 (la catena pesante "variante KK") e le sostituzioni amminoacidiche L351D e L368E nel secondo dominio (la catena pesante "variante DE"), o viceversa. È stato precedentemente dimostrato nei

nostri brevetti US 9,248,181 e US 9,358,286, così come nella domanda PCT WO 2013/157954, che la variante DE e la variante KK si appaiano preferibilmente per formare eterodimeri (le cosiddette molecole bispecifiche "DEKK"). L'omodimerizzazione delle catene pesanti varianti DE (omodimeri DEDE) o delle catene pesanti varianti KK (omodimeri KKKK) avviene difficilmente a causa della forte repulsione tra i residui carichi nell'interfaccia CH3-CH3 tra catene pesanti identiche. In una forma di realizzazione, la combinazione di catena pesante/catena leggera che comprende il dominio variabile che si lega a CD3 comprende una variante KK della catena pesante. In questa forma di realizzazione, la combinazione di catena pesante/catena leggera che comprende il dominio variabile che si lega ad un antigene diverso da CD3 comprende una variante DE della catena pesante. In una forma di realizzazione preferita, l'antigene diverso da CD3 è CLEC12A. In una forma di realizzazione preferita, la VH del dominio variabile che si lega a CLEC12A è MF4327_VH, come descritto nella figura 24. Alcuni anticorpi sono modificati nella regione CH2/cerniera inferiore, per esempio per ridurre l'interazione del recettore per l'Fc o per ridurre il legame al C1q. In alcune forme di realizzazione,

l'anticorpo dell'invenzione è un anticorpo IgG con un dominio CH2 e/o della cerniera inferiore mutante, in modo tale che l'interazione dell'anticorpo IgG bispecifico con un recettore per l'Fc gamma sia ridotta. Un tale dominio CH2 e/o della cerniera inferiore mutante comprende preferibilmente una sostituzione amminoacidica nelle posizioni 235 e/o 236 (numerazione di Kabat), preferibilmente una sostituzione L235G e/o G236R.

L'invenzione descrive inoltre un metodo di trattamento del cancro o di rischio di un cancro in un soggetto, comprendente la somministrazione al soggetto che lo richieda di un anticorpo bispecifico che si lega al CD3 umano, il quale anticorpo comprende una catena pesante ed una catena leggera in cui la suddetta catena pesante comprende una regione variabile che

comprende la sequenza amminoacidica:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVAS GFTFS SYGMH WVRQA PGKGL EWVAA

IWYX₁X₂RKQDY ADSVK GRETI SRDNS KNTLY LQMNS LRAED TAVYY CTRGT

GYNWF DPWGQ GTLVT VSS

con 0-10, preferibilmente 0-5 inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche o una loro combinazione in una o più posizioni diverse dalla posizione indicata mediante X₁X₂;

in cui

X₁ = N ed X₂ = A;

$X_1 = N$ ed $X_2 = T$;

$X_1 = S$ ed $X_2 = G$;

$X_1 = H$ ed $X_2 = G$;

$X_1 = D$ ed $X_2 = G$; o

$X_1 = H$ ed $X_2 = A$; ed

una combinazione di catena pesante-catena leggera (H/L) che si lega ad un antigene tumorale.

La catena leggera comprende preferibilmente una regione variabile della catena leggera comune. La suddetta regione variabile della catena leggera comune comprende preferibilmente una regione variabile della catena leggera O12/IgVk1-39. La suddetta regione variabile della catena leggera è preferibilmente una regione variabile O12/IgVk1-39*01 della linea germinale. La suddetta regione variabile della catena leggera comprende preferibilmente la catena leggera kappa IgVk1-39*01/IGJk1*01 o IgVk1-39*01/IGJk5*01. La regione variabile della catena leggera comprende preferibilmente la catena leggera kappa della linea germinale IgVk1-39*01/IGJk1*01 o IgVk1-39*01/IGJk5*01. La suddetta regione variabile della catena leggera comprende preferibilmente le sequenze amminoacidiche:
DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK
LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ
SYSTP PTEGQ GTKVE IK o DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA

SQSIG SYLNW YQOKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD
FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK con 0-5
inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni
amminoacidiche o una loro combinazione.
Preferibilmente, la combinazione di catene di catena
pesante/catena leggera (H/L) che si lega ad un
antigene tumorale si lega a CLEC12A.

L'anticorpo è preferibilmente un anticorpo umano o
umanizzato. Preferibilmente, l'anticorpo comprende due
differenti catene immunoglobuliniche pesanti con
domini di eterodimerizzazione compatibili. I suddetti
domini di eterodimerizzazione compatibili sono
preferibilmente domini di eterodimerizzazione CH3
della catena pesante immunoglobulinica compatibili. Il
suddetto anticorpo bispecifico è preferibilmente un
anticorpo IgG con un dominio CH2 e/o della cerniera
inferiore mutante, in modo tale che l'interazione
dell'anticorpo IgG bispecifico con un recettore per
l'Fc gamma sia ridotta. Il dominio CH2 e/o della
cerniera inferiore mutante comprende preferibilmente
una sostituzione amminoacidica nelle posizioni 235 e/o
236 (numerazione di Kabat), preferibilmente una
sostituzione L235G e/o G236R. L'anticorpo comprende
preferibilmente una catena leggera comune.

Viene inoltre fornito un anticorpo bispecifico che si

lega al CD3 umano, il quale anticorpo comprende una catena pesante ed una catena leggera in cui la suddetta catena pesante comprende una regione variabile che comprende la sequenza amminoacidica:
QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVAS GFTFS SYGMH WVRQA PGKGL EWVAA
IWYX₁X₂RKQDY ADSVK GRFTI SRDNS KNTLY LQMNS LRAED TAVYY CTRGT
GYNWF DPWGQ GTLVT VSS

con 0-5 sostituzioni amminoacidiche in una o più posizioni diverse dalla posizione indicata mediante X₁X₂ e diverse dalle regioni CDR;

in cui

X₁ = N ed X₂ = A;

X₁ = N ed X₂ = T;

X₁ = H ed X₂ = G;

X₁ = D ed X₂ = G; o

X₁ = H ed X₂ = A; e la suddetta catena leggera comprende la regione variabile della catena leggera O12/IgVK1-39 della figura 23A con 0-5 sostituzioni amminoacidiche ed una catena pesante ed una catena leggera che si legano ad un antigene tumorale.

Viene inoltre descritto un anticorpo dell'invenzione o un suo derivato o una composizione farmaceutica dell'invenzione per uso nel trattamento di un soggetto che lo richieda. Per il trattamento di un soggetto che ha o è a rischio di avere un tumore è preferibile che l'anticorpo sia un anticorpo bispecifico

dell'invenzione. In cui preferibilmente l'anticorpo di legame per CD3 comprende una combinazione di catene pesanti/leggere che si lega ad un antigene tumorale. L'anticorpo bispecifico è preferibilmente un anticorpo legante CD3/CLEC12A.

Vengono descritti anticorpi bispecifici contro CD3/antigene tumorale e composizioni farmaceutiche comprendenti tali anticorpi bispecifici per uso nel trattamento di tumori solidi o ematologici. I tumori solidi preferiti sono di origine epiteliale; cancro ginecologico, quale tumori ovarici e dell'endometrio; cancro della prostata, cancro del cervello o qualsiasi altro tumore solido.

Viene descritto anche un anticorpo bispecifico contro CD3/antigene tumorale dell'invenzione o un suo derivato o composizioni farmaceutiche comprendenti tale anticorpo bispecifico o un suo derivato per uso nel trattamento di varie leucemie e malattie preleucemiche di origine mieloide, ma anche di linfomi dei linfociti B. Le malattie che possono essere trattate includono leucemie mieloidi o malattie preleucemiche, quali leucemia mieloide acuta (LMA), sindrome mielodisplastica (SMD) e leucemia mieloide cronica (LMC) e linfomi di Hodgkin e la maggior parte dei linfomi non Hodgkin. Anche LLA-B; LLA-T, linfoma a

cellule mantellari sono anch'essi bersagli preferiti per il trattamento con l'anticorpo dell'invenzione. Così, viene anche descritto un anticorpo bispecifico IgG a lunghezza intera secondo l'invenzione per uso come composto farmaceutico nel trattamento di sindrome mielodisplastica (SMD), leucemia mieloide cronica (LMC), mieloma multiplo (MM) o preferibilmente leucemia mieloide acuta (LMA). Viene inoltre descritto un uso di un anticorpo IgG bispecifico secondo l'invenzione nella preparazione di un medicamento per il trattamento o per la prevenzione di SMD, LMC, MM o preferibilmente LMA. È preferibile che l'antigene tumorale sia CLEC12A.

La quantità di anticorpo secondo l'invenzione da somministrare ad un paziente è tipicamente nella finestra terapeutica, il che significa che viene utilizzata una quantità sufficiente per raggiungere un effetto terapeutico, mentre la quantità non supera un valore soglia che conduce ad un'inaccettabile entità di effetti collaterali. Minore è la quantità dell'anticorpo richiesta per raggiungere un effetto terapeutico desiderato, maggiore sarà tipicamente la finestra terapeutica. Un anticorpo secondo l'invenzione che esercita sufficienti effetti terapeutici a basso dosaggio è, quindi, preferito.

La LMA viene diagnosticata ogni anno ad approssimativamente 30000 pazienti in Europa e negli Stati Uniti. La maggioranza di questi pazienti ha un'età di 60 anni o superiore. L'età avanzata è un importante fattore determinante negativo dell'esito della LMA, e la sopravvivenza a lungo termine (a 5 anni) dei pazienti con LMA più anziani trattati intensivamente è di approssimativamente il 10%. In quasi tutti i pazienti che hanno ottenuto la remissione dopo chemioterapia di induzione, si osserva la progressione della malattia entro 3 anni. L'attuale trattamento a seguito della remissione ha mostrato un'utilità limitata, semmai presente, nei pazienti con LMA più anziani. Quindi, rimane una quantità significativa di leucemia resistente residua, e la sottopopolazione di cellule leucemiche resistenti ai farmaci che sopravvive genera rapidamente una recidiva. Sono richiesti nuovi tipi di farmaci con modalità d'azione completamente differenti per indirizzare a bersaglio queste cellule tumorali di LMA non sensibili alla chemioterapia in sforzi per indurre e sostenere remissioni complete. Sebbene la remissione completa (CR) possa essere ottenuta con diverse combinazioni chemioterapiche intense in più del 50% dei pazienti con LMA anziani ed attorno all'80% nei

pazienti più giovani, i progressi della risposta o della sopravvivenza sono rimasti un'importante sfida della sperimentazione. In una meta-analisi di rete recentemente pubblicata di 65 studi clinici randomizzati (15110 pazienti), nei pazienti con LMA più anziani la maggior parte dei regimi di induzione in fase di sperimentazione modificati ha profili di efficacia simili o perfino peggiori rispetto al convenzionale regime di induzione 3+7 con daunorubicina e citarabina. Questo trattamento standard della LMA è associato a morbilità elevata ed anche a mortalità. La maggioranza dei pazienti in CR ha una ricaduta dovuta alle cellule staminali leucemiche rimanenti dopo la chemioterapia. Inoltre, l'intensificazione della dose è limitata a causa dell'inaccettabile tossicità. Sta quindi emergendo una necessità urgente per nuove modalità di trattamento, preferibilmente con minore tossicità, specialmente nei pazienti con LMA anziani.

Si è potuto ottenere il trattamento di una LMA non rispondente alla chemioterapia mediante il ridirezionamento di linfociti T dal sistema immunitario proprio del paziente verso cellule tumorali di LMA e mediante la successiva attivazione specifica per il bersaglio tumorale dei linfociti T

utilizzando un anticorpo bispecifico. Questo procedimento è noto anche come cosiddetto "approccio di ingaggio dei linfociti T". In questo modo, il sistema immunitario dei pazienti viene rafforzato e indirizzato nuovamente a bersaglio per attaccare ed eliminare le cellule tumorali di LMA. La presente invenzione fornisce anticorpi IgG bispecifici contro CD3xCLEC12A che ridirigono efficientemente i linfociti T verso le cellule tumorali di LMA, inducendo quindi la lisi delle cellule tumorali di LMA. Gli anticorpi bispecifici contro CD3xCLEC12A sono quindi una terapia mirata con meno effetti collaterali, che eradica specificamente blasti e cellule staminali leucemiche di LMA allo scopo di migliorare la prognosi dei pazienti con LMA. Poiché CLEC12A viene espresso sulle cellule staminali leucemiche (CSL) e non sulle cellule staminali ematopoietiche normali, ci si attende che la terapia diretta nei confronti di questo antigene elimini le CSL risparmiando allo stesso tempo le cellule staminali normali. Questi anticorpi bispecifici IgG a lunghezza intera vengono valutati clinicamente in pazienti con LMA che hanno avuto una ricaduta e/o sono refrattari. L'efficacia clinica viene analizzata utilizzando la riduzione dei blasti di LMA nel midollo osseo come criterio di risposta

obiettiva. Una IgG bispecifica efficace per la LMA fornisce una nuova opzione terapeutica per un grande segmento di pazienti per cui non vi è attualmente nessun trattamento disponibile. Oltre a fornire un mezzo per ottenere remissioni durature, questa alternativa del trattamento ha anche un potenziale curativo per la LMA quando applicata durante la remissione. Molto probabilmente essa avrà l'impatto maggiore in situazioni di malattia minima residua (MMR). L'aspettativa è che la percentuale di ricadute scenderà a causa dell'eradicazione della MMR. Così, l'impatto per il paziente con LMA di questa nuova modalità di trattamento sarebbe quello di un trattamento meno tossico con una minore percentuale di ricaduta, che porta ad un miglioramento dell'esito associato ad una migliore qualità di vita.

Gli anticorpi 15C3 e 3056 descritti nell'arte condividono la stessa regione variabile della catena pesante ma differiscono per la regione variabile della catena leggera. Sono state osservate variazioni da lotto a lotto nel legame potenziale dell'anticorpo in lotti dell'anticorpo 3056. Ciò non si è osservato per l'anticorpo 15C3. Poiché gli anticorpi differiscono per la catena leggera, la ragione della differenza del comportamento risiederebbe nella differente catena

leggera. Una SDS-PAGE ha rivelato che l'anticorpo 3056 era intatto anche nei lotti con anticorpo meno attivo. La modellazione 3D dei domini variabili degli anticorpi ha rivelato alcune variazioni nel ripiegamento del dominio VH/VL tra i due anticorpi. Poiché queste variazioni potrebbe spiegare il differente comportamento degli anticorpi, sono stati progettati degli esperimenti per rendere il ripiegamento del dominio VH/VL dell'anticorpo 3056 più simile a quello di 15C3. Sfortunatamente, ciò non ha spiegato le differenze tra gli anticorpi 15C3 e 3056. La focalizzazione isoelettrica (IEF) ha rivelato solo leggere differenze tra 15C3 (3055) e 3056 legate alla banda principale ad un punto isoelettrico elevato dell'anticorpo. Analisi successive che utilizzano CIEEX-HPLC, una tecnica cromatografica che permette la separazione di varianti di carica, ha rivelato, a seconda del lotto, uno spettro di ritenzione molto complesso con un ampio profilo di eluizione per l'anticorpo 3056, ciò in contrasto con il profilo osservato per 15C3 (3055). Inoltre, è stato trovato che il profilo di 3056 è cambiato significativamente nel tempo, suggerendo che l'anticorpo 3056 è insitamente instabile.

Solo quando sono state progettate varianti in cui la

catena 3056_VH è stata cambiata in una o due posizioni specifiche, il comportamento è cambiato. Il comportamento è variato tra instabile, nessuna attività di legame fino a legame senza significativa variabilità da lotto a lotto.

La catena pesante del 3056 contiene un motivo strutturale di deammidazione NG nella sua regione CDR2, WYNGRKQ, che potrebbe essere coinvolto nell'eterogeneità di carica osservata dell'anticorpo 3056. La modellazione in silico dei Fab di 15C3 e 3056 non ha rivelato una differenza significativa nel ripiegamento del motivo strutturale di deammidazione NG nella regione HCDR2. Ciò costituisce una prova contro il coinvolgimento di questo motivo strutturale nell'instabilità osservata dell'anticorpo 3056. Sorprendentemente, tuttavia, le variazioni come indicate nelle rivendicazioni hanno significativamente ridotto la variazione osservata da lotto a lotto degli anticorpi dell'invenzione.

L'invenzione fornisce inoltre un anticorpo comprendente un dominio variabile che si lega a CD3 ed un dominio variabile che si lega a CLEC12A, in cui il dominio variabile che si lega a CLEC12A ha una VH comprendente la sequenza amminoacidica identificata mediante i numeri 4327 della figura 24 con 0-10,

preferibilmente 0-5 inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche o una loro combinazione, ed il dominio variabile che si lega a CD3 ha una VH comprendente la sequenza amminoacidica identificata mediante i numeri 5192, 5193; 5196; 5197; 5351; 5354; 5356; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694 come descritto nelle figure 12, 25 e 28 con 0-5 sostituzioni amminoacidiche in una o più posizioni diverse dalle posizioni 54 e 55 e diverse dalle regioni CDR. La catena leggera comprende preferibilmente un dominio variabile con gli amminoacidi come descritti nelle figure 23, preferibilmente 23B.

L'invenzione fornisce inoltre un anticorpo comprendente un dominio variabile che si lega a CD3 ed un dominio variabile che si lega a CLEC12A, in cui il dominio variabile che si lega a CLEC12A ha una VH comprendente la sequenza amminoacidica identificata mediante i numeri 4327 della figura 24 con 0-10, preferibilmente 0-5 inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche o una loro combinazione, ed il dominio variabile che si lega a CD3 ha una VH comprendente la sequenza amminoacidica identificata mediante il numero 5196, come descritto nella figura 12, con 0-5 sostituzioni amminoacidiche

in una o più posizioni diverse dalle posizioni 54 e 55 e diverse dalle regioni CDR.

La catena pesante del dominio variabile che si lega a CD3 ha preferibilmente la sequenza amminoacidica identificata mediante i numeri 5196; 5197; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694, come descritto nelle figure 12 e 25, con 0-5 sostituzioni amminoacidiche in una o più posizioni diverse dalle posizioni 54 e 55 e diverse dalle regioni CDR. Il dominio variabile che si lega a CD3 ha preferibilmente la sequenza amminoacidica identificata mediante il numero 5196, come descritto nelle figure 12, con 0-5 sostituzioni amminoacidiche in una o più posizioni diverse dalle posizioni 54 e 55 e diverse dalle regioni CDR. In una forma di realizzazione preferita la regione variabile della catena pesante comprende 0-4, preferibilmente 0-3, preferibilmente 0-2, preferibilmente 0-1 e preferibilmente 0 sostituzioni amminoacidiche rispetto alla sequenza amminoacidica indicata. Per la catena pesante contro CD3 le sostituzioni amminoacidiche indicate sono in posizioni diverse dalle posizioni 54 e 55 e diverse dalle regioni CDR. Una combinazione di un'inserzione, un'addizione, una delezione o una sostituzione è una combinazione se le sequenze allineate non differiscono per più di 10,

preferibilmente non più di 5 posizioni. Un'interruzione in una delle sequenze allineate vale per tanti amminoacidi quanti saltati nell'altra sequenza.

L'invenzione fornisce inoltre un anticorpo comprendente un dominio variabile che si lega a CD3 ed un dominio variabile che si lega a CLEC12A, in cui il dominio variabile che si lega a CLEC12A ha una VH comprendente la sequenza amminoacidica identificata mediante il numero 4327 della figura 24, ed il dominio variabile che si lega a CD3 ha una VH comprendente la sequenza amminoacidica identificata mediante i numeri 5192, 5193; 5196; 5197; 5351; 5354; 5356; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694, come descritto nelle figure 12, 25 e 28. La catena pesante del dominio variabile che si lega a CD3 ha preferibilmente la sequenza amminoacidica identificata la mediante i numeri 5196; 5197; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694, come descritto nelle figure 12 e 25. Il dominio variabile che si lega a CD3 ha preferibilmente la sequenza amminoacidica identificata mediante il numero 5196, come descritto nelle figure 12.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

Figura 1. IEF di PG3055 e PG3056.

Figura 2. Analisi CIEX-HPLC di PG3055 e PG3056.

Figura 3. Variabilità e stabilità da lotto a lotto di PG3055 e PG3056 analizzate mediante analisi CIEX-HPLC. Lotti 3055 a sinistra, nel tempo, lotti 3056 a destra, nel tempo, con i campioni nella parte superiore conservati a -80°C , i campioni nella parte inferiore conservati a $2-8^{\circ}\text{C}$ per > 3 mesi.

Figura 4. Analisi di citometria a flusso per il legame di PG3055 e PG3056 per CD3 su linfociti T umani purificati dopo incubazione in terreno IMDM+FBS al 10% a $2-8^{\circ}\text{C}$ o 37°C per 7 giorni. PG3055 e PG3056: incubati in terreno IMDM+FBS al 10% a $2-8^{\circ}\text{C}$ per 7 giorni. PG3055 37°C e PG3056 37°C : PG3055 e PG3056 incubati in terreno IMDM+FBS al 10% a 37°C per 7 giorni.

Figura 5. Sinistra: modello di omologia di Fab di PG3056 focalizzato su domini variabili, VL in grigio chiaro, VH in nero, anse HCDR1-3 in grigio chiaro. Vengono indicati i residui Asn54 e Gly55 che formano il motivo strutturale di deamidazione in HCDR2. Destra: sovrapposizione di modelli di omologia di Fab di PG3055 (grigio chiaro) e PG3056 (grigio scuro).

Figura 6. Allineamento di VH di MF3056 (di MF3056_VH) contro la sequenza VH3-33 della linea germinale.

Figura 7. Allineamento di VH di MF3056 contro VH di MF3872, MF3873 e MF3905.

Figura 8. Analisi di citometria a flusso per il legame

per CD3 su cellule HPB-ALL delle varianti PG3872, PG3873 e PG3905; PG3056 è stato incluso come controllo di riferimento.

Figura 9. Allineamento di VH di MF3056 contro VH di MF3874, MF3878, MF3883, MF3886 e MF3891.

Figura 10. Analisi di citometria a flusso per il legame per CD3 su cellule HPB-ALL delle varianti PG3874, PG3878, PG3883, PG3886 e PG3891; PG3056 è stato incluso come controllo di riferimento.

Figura 11. Analisi CIEEX-HPLC di PG3891.

Figura 12. Allineamento di VH di MF3056 contro VH di MF5192-5197 VH.

Figura 13. Analisi di citometria a flusso per il legame per CD3 su cellule HPB-ALL delle varianti PG5192-5197; PG3056 è stato incluso come controllo di riferimento.

Figura 14. Analisi di IEF di PG5196p06.

Figura 15. Cromatogramma di CIEEX-HPLC di PG5196.

Figura 16. Legame di bsAb DM-Fc 5196x4327 per CD3 (HPB-ALL) e CLEC12A (HL-60) espressi sulla membrana.

Figura 17. bsAb DM-Fc 5196x4327 ha mantenuto l'attivazione specifica per CLEC12A dei linfociti T CD4 e CD8, indicata dalla sovraregolazione del marcatore di attivazione precoce CD69. Il bsAb e le IgG di controllo sono stati testati a 1000ng/ml. I

dati di citometria a flusso relativi all'attivazione dei linfociti T vengono espressi come percentuale di cellule positive per CD69 nelle popolazioni di linfociti T CD4+ o CD8+. HD1 e HD2 rispecchiano due esperimenti differenti utilizzando i linfociti T ottenuti da donatori sani differenti.

Figura 18. 5196x4327 ha indotto la lisi delle cellule bersaglio mediata dall'antigene.

Figura 19. Sensogrammi che mostrano le costanti di associazione e di dissociazione di CD3 δ ϵ -Fc (A) e proteina CLEC12A (B) verso bsAb DM-Fc 5196x4327 immobilizzati. I sensogrammi mostrano la risposta (quantità di proteina legata al chip, in unità artificiali) in funzione del tempo (in secondi). Entrambi i riquadri mostrano i sensogrammi ottenuti utilizzando un intervallo di concentrazione dell'antigene (a colori) e le rispettive interpolazioni della curva eseguite utilizzando il programma BIAevaluation (in nero).

Figura 20. Un campione di un paziente con LMA primaria è stato fenotipizzato per l'espressione di CLEC12A e per la frazione di linfociti T e blasti di LMA mediante analisi di citometria a flusso all'inizio (giorno = 0) della co-coltura. Dopo giorni 7 di co-coltura con il bsAb DM-Fc 5196x4327 o con il controllo

isotipico, la frazione ed il numero totale di linfociti T e blasti di LMA sono stati quantificati mediante analisi di citometria a flusso.

Figura 21. Analisi di DSC come descritto nell'esempio 9.

Figura 22. Sequenza variabile della catena pesante (VH) dell'anticorpo 15C3 descritto in WO 2005/118635. La pubblicazione brevettuale descrive due varianti dell'anticorpo 15C3. Entrambe le varianti hanno lo stesso dominio variabile della catena pesante, ma questo dominio variabile della catena pesante viene combinato con due differenti domini variabili della catena leggera. Laddove si faccia riferimento qui all'anticorpo 15C3, si fa riferimento ad un anticorpo avente il dominio variabile della catena pesante come descritto in questa figura in combinazione con dominio variabile della catena leggera L2 come indicato in questa figura. Il prodotto Fab della VH di 15C3 più la catena leggera L2 viene qui indicato inoltre come MF3055.

L'anticorpo PG3056 ha la VH come qui descritto in combinazione con la regione variabile della catena leggera IGKV1-39, come descritto in questa figura. Il prodotto Fab della VH di 15C3 più la catena leggera IGKV1-39 è indicato inoltre come MF3056.

Figura 23. L'anticorpo dell'invenzione ha preferibilmente una catena leggera comune. A) La catena leggera comune comprende preferibilmente la sequenza amminoacidica descritta come sequenza IGKV1-39 in questa figura. B) In una forma di realizzazione preferita, la catena leggera comune comprende la sequenza amminoacidica descritta come IGKV1-39/jk1 o IGKV1-39/jk5. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, la catena leggera comune comprende la sequenza amminoacidica di IGKV1-39/jk1 come descritto in questa figura.

Figura 24. Sequenza amminoacidica della regione VH di un Fab dell'anticorpo di legame anti-CLEC12A (MF4327) e sequenza amminoacidica della regione VH di un Fab di legame anti-tossoide del tetano (TT) (MF1337). Insieme alla sequenza amminoacidica della catena leggera comune descritta nella figura 23, queste VH formano domini variabili dei Fab MF4327 e MF1337 che si legano a CLEC12A ed al tossoide tetanico, rispettivamente.

Figura 25. Esempi di varianti leganti CD3 di MF5196 sono MF5603, MF5616, MF5626, MF5630, MF5648, MF5661 e MF5694, tutte contenenti la regione VL di IGKV1-39/IGKJ1 umana riarrangiata. Viene indicata la sequenza amminoacidica della VH dei Fab.

Figura 26. Legame di anticorpi comprendenti VH di

MF5196; VH di MF5603; VH di MF5616; VH di MF5626; VH di MF5630; VH di MF5648; VH di MF5661 e VH di MF5694 ed una catena leggera comune, come descritto nella figura 23B, con CD3 espresso sulla membrana su cellule HPB-ALL, come analizzato mediante citometria a flusso.

Figura 27. Cromatogramma da CIEEX-HPLC di PG5661.

Figura 28. I Fab leganti CD3 MF5351, MF5354 e MF5356, costituiti dalla regione VL di IGKV1-39/IGKJ1 umana riarrangiata hanno la rispettiva VH come descritto.

Figura 29. Formato PG di legame per CD3 espresso sulla membrana su cellule HPB-ALL; tutti questi esempi si sono legati a CD3.

ESEMPI

Come qui utilizzato "MFXXXX", in cui X è indipendentemente una cifra 0-9, si riferisce ad un Fab comprendente un dominio variabile in cui la VH ha la sequenza amminoacidica identificata mediante le 4 cifre. Se non indicato diversamente, la regione variabile della catena leggera del dominio variabile ha tipicamente una sequenza delle figure 23, tipicamente 23B. "VH di MFXXXX" si riferisce alla sequenza amminoacidica della VH identificata mediante le 4 cifre. MF comprende inoltre una regione costante di una catena leggera ed una regione costante di una catena pesante che normalmente interagisce con una

regione costante di una catena leggera. PG si riferisce ad un anticorpo monospecifico comprendente catene pesanti e leggere identiche. PB si riferisce ad un anticorpo bispecifico con due catene pesanti differenti. La regione variabile delle catene pesanti è differente, e tipicamente lo è anche la regione CH3, in cui una delle catene pesanti ha una mutazione KK del suo dominio CH3 e l'altra ha la mutazione complementare DE del suo dominio CH3 (si veda per riferimento PCT/NL2013/050294 (pubblicata come WO 2013/157954)).

Esempio 1: eterogeneità di carica dei mAb 3055 e 3056

È stata utilizzata la focalizzazione isoelettrica (IEF) per determinare il pI e l'eterogeneità di carica di PG3056, un anticorpo monoclonale IgG1 a lunghezza intera comprendente la VH di MF3056 appaiata con la catena leggera comune IGVK1-39/JK1, e di PG3055, un anticorpo monoclonale IgG1 a lunghezza intera che comprende la stessa VH appaiata con la catena leggera VL2-IGKV1-13 di 15C3. A questo scopo, un gel di focalizzazione con intervallo di pI di 6-11 (Webscientific, numero di catalogo 1006-03) è stato fatto correre su un'unità per elettroforesi Multiphor II di GE Healthcare provvista di una piastra di raffreddamento, che è stata raffreddata a 10°C. 10 µg

di campione non trattato sono stati caricati nella fenditura per il campione vicino ad un marcatore ad elevato intervallo di pI (GE Healthcare, numero di catalogo 17047301V). Il programma di elettroforesi è consistito di tre fasi; focalizzazione iniziale per 10 minuti a 500 V, cui seguono 90 minuti a 1500 V ed infine una fase di focalizzazione a 2000 V per 10 minuti. Quindi, il gel è stato fissato e colorato utilizzando colorante Coomassie colloidale (Pierce, numero di catalogo 24590).

L'analisi di IEF di PG3056 e PG3055 ha avuto come risultato il gel mostrato nella figura 1. Per PG3055 si osserva una banda principale ad elevato pI (~9) con una banda satellite ad un valore di pI alquanto superiore. PG3056 ha mostrato un andamento di IEF simile, tuttavia a valori di pI leggermente superiori e con una banda principale leggermente più diffusa.

Entrambe le IgG sono state analizzate utilizzando la cromatografia HPLC a scambio cationico (CIEX-HPLC) per analizzare la loro eterogeneità di carica utilizzando un metodo ortogonale. La CIEX-HPLC è stata eseguita a temperatura ambiente su un sistema di HPLC Dionex provvisto di una colonna da 7 μ m SP-STAT e di un rivelatore UV/Vis. Sono stati iniettati 10 μ g di campione; è stato utilizzato un gradiente di tampone

fosfato 25mM a pH 6,0 con concentrazione crescente di NaCl per separare le varianti di carica anticorpali. I dati sono stati analizzati utilizzando il programma Chromeleon.

I cromatogrammi da CIEX-HPLC di PG3055 e PG3056 vengono mostrati nella figura 2. PG3055 mostra un picco principale a 18,8 minuti fiancheggiato da piccoli picchi rappresentanti isoforme acide e basiche della IgG. Sorprendentemente, il cromatogramma di PG3056 contiene picchi multipli nell'arco di un ampio intervallo di tempo; due ampi picchi principali sono visibili a 18,4 e 20,4 minuti. I cromatogrammi mostrano un'eterogeneità di carica considerevolmente aumentata dell'anticorpo anti-CD3 con catena leggera comune IGVK1-39/JK1 (PG3056) in confronto alla IgG con catena leggera VL2-IGKV1-13 di 15C3 (PG3055).

La CIEX-HPLC è stata utilizzata anche per verificare la variabilità e la stabilità da lotto a lotto degli anticorpi anti-CD3. Entrambi gli anticorpi sono stati analizzati dopo essere stati conservati a 2-8°C per più di 3 mesi e dopo conservazione a lungo termine a -80°C. La sovrapposizione dei campioni PG3055 (figura 3, sinistra) mostra che viene osservata una differenza marginale tra i campioni; le relative aree di picco dei picchi minori a 17,1 minuti e 19,8 minuti cambiano

leggermente dopo la conservazione a 2-8°C per un lungo periodo di tempo. Le differenze osservate tra i campioni PG3056 (figura 3, destra) sono molto più sostanziali. Il picco a 20,4 minuti diminuisce significativamente a seguito della conservazione a 2-8°C, mentre il picco a 18,4 minuti aumenta fino a diventare il picco principale del campione. Altri picchi di eluizione precoci rappresentanti altre isoforme acide della IgG mostrano anche un incremento relativo dell'area dei picchi, per esempio del picco a 16,4 minuti. Le variazioni osservate nei cromatogrammi da CIEX-HPLC dopo la conservazione per un tempo prolungato a 2-8°C indicano che l'anticorpo anti-CD3 comprendente la catena leggera comune IGVK1-39/JK1 non è stabile mentre viene conservato in queste condizioni, mentre l'anticorpo PG3055 comprendente la catena leggera VL2-IGKV1-13 di 15C3 è molto più stabile.

Esempio 2: influenza della variazione da lotto a lotto dell'anticorpo PG3056 sul legame per l'antigene

Per valutare la stabilità degli anticorpi anti-CD3 in presenza di siero, gli anticorpi PG3055 e PG3056 sono stati diluiti a 10µg/ml in IMDM (Invitrogen, numero di catalogo 21980-065) arricchito con FBS al 10% (PAA, numero di catalogo A15-101) e successivamente incubati

a 37°C per sette giorni. In questa analisi è stato incluso un controllo isotipico IgG (PG1207). Dopo sette giorni, il legame delle IgG per CD3 è stato valutato mediante analisi di citometria a flusso su linfociti T purificati mediante MACS derivati da donatori sani. Per confronto, nell'analisi di citometria a flusso sono stati inclusi PG3055 e PG3056 conservati nello stesso terreno per sette giorni a 2-8°C. Il legame per CD3 di tutti gli anticorpi è stato testato a concentrazioni di 10, 1, 0,1 e 0,01µg/ml, diluite in IMDM+FBS al 10%. Gli anticorpi legati sono stati visualizzati con un anticorpo anti-Fc umano in capra (Southern Biotech, 2043-02), secondo la procedura mediante FACS come descritta precedentemente in WO 2014/051433, con la differenza che la colorazione è stata eseguita in IMDM+FBS al 10%. I dati (figura 4) mostrano che PG3055 e PG3056 hanno mostrato un legame simile per i linfociti T quando incubati a 2-8°C in presenza di siero. Mentre il legame di PG3055 non è stato influenzato da un'incubazione di sette giorni a 37°C in IMDM+FBS al 10% (PG3055 contro PG3055 37°C), il legame di PG3056 per CD3 sui linfociti T è stato significativamente ridotto (PG3056 contro PG3056 37°C).

In conclusione, PG3056, l'anticorpo anti-CD3 comprendente la catena leggera comune IGVK1-39/JK1, ha mostrato un legame fortemente ridotto per CD3 dopo l'incubazione con siero a 37°C per 7 giorni. Al contrario, l'anticorpo PG3055 ha mantenuto il legame completo per CD3 nelle stesse condizioni.

Esempio 3: qual è la differenza tra gli anticorpi PG3055 e PG3056?

Gli anticorpi PG3055 e PG3056 hanno sequenze identiche eccetto che per la regione variabile della catena leggera. Apparentemente, la catena leggera comune non funziona bene nel contesto delle altre sequenze amminoacidiche dell'anticorpo ed in particolare con la regione variabile della catena pesante, con cui è a stretto contatto. Il modo più ovvio per cercare e correggere la carenza dell'anticorpo 3056 sarebbe quello di vedere se la catena leggera comune può essere alterata in qualunque modo per renderla più simile alla catena leggera nell'anticorpo 3055. Inoltre, la catena leggera dell'anticorpo PG3056 non è stata scelta per far parte del sito di legame per l'antigene che si lega alla molecola CD3. La regione variabile della catena pesante è stata scelta per quello scopo. Questa è un'altra ragione per vedere se la catena leggera comune può essere resa più simile

alla catena leggera nell'anticorpo progenitore PG3055. Per scoprire dove le regioni variabili di PG3055 e PG3056 differivano come conseguenza della differente catena leggera, le loro regioni Fab sono state modellizzate. Un modello di omologia della regione Fab di PG3056 e PG3055 è stato costruito utilizzando Modeller (Sali et al., 1993: J. Mol. Biol. 234, 779-815). Una struttura modello con punteggio di energia ottimale è stata scelta dall'insieme di strutture generato. Sono stati utilizzati algoritmi di ottimizzazione delle catene laterali e di minimizzazione dell'energia per sostituire le catene laterali stampo dove queste differivano dalla sequenza bersaglio. I modelli di omologia dei Fab 3055 e 3056 sono stati esaminati visivamente utilizzando Yasara (<http://www.yasara.org>). La sovrapposizione dei modelli per PG3055 e PG3056 (figura 5, immagine a destra) mostra che le differenze di sequenza nella catena leggera causano solo alcune variazioni strutturali; l'orientamento di alcune parti della catena leggera rispetto alla catena pesante viene in parte cambiato tra le due IgG. Le parti modificate potrebbero essere insitivamente meno stabili ed essere la causa ultima delle differenze di stabilità osservate. In alternativa, le parti modificate

potrebbero essere più o meno sensibili a differenti processi inducenti eterogeneità. Vari processi, noti e non noti, possono essere la causa delle caratteristiche osservate per l'anticorpo PG3056. Modifiche enzimatiche e non enzimatiche compresi formazione di legami disolfuro, glicosilazione, ciclizzazione della glutammina N-terminale, processamento della lisina carbossiterminale, deammidazione, ossidazione, glicazione e scissione del legame peptidico sono tra i procedimenti che possono causare l'eterogeneità (Liu et al. Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 97, 2426-2447 (2008)). In relazione al tipo di modifica, l'eterogeneità degli anticorpi monoclonali può essere introdotta mediante processi intracellulari e processi extracellulari che, per esempio, hanno luogo in siero, ascite e/o terreno di coltura cellulare. L'eterogeneità può anche essere introdotta mediante incubazione con tamponi, durante il procedimento di purificazione, conservazione, in differenti condizioni di stress, quali temperatura elevata o esposizione a luce intensa.

La modellazione non ha individuato un amminoacido o una regione particolari per focalizzare i tentativi di mutazione della regione variabile di PG3056. Le differenze osservate tra i modelli di omologia di

PG3055 e PG3056 sono state marginali.

Nella presente invenzione è stato trovato che non vi è alcuna necessità di cambiare la sequenza amminoacidica della catena leggera dell'anticorpo PG3056. L'adattamento della catena pesante può produrre un anticorpo con buone proprietà di legame, buona stabilità e buona uniformità anche quando la catena pesante è presente in una regione variabile con la catena leggera comune. Come sarà esemplificato in maggior dettaglio qui sotto, è stato sorprendentemente trovato che modifiche specifiche nella regione CDR2 della catena pesante sono tollerate per quanto riguarda il legame e forniscono l'anticorpo con la stabilità e l'uniformità desiderate.

Le modifiche portano ad una modifica in un motivo strutturale di deamminazione NG nella regione CDR2 della catena pesante. La regione HCDR2 sia di PG3055 che di PG3056 comprende i residui Asn54 e Gly55. I residui sono esposti sulla superficie in entrambi gli anticorpi, com'è mostrato nella figura 5. La posizione strutturale e l'esposizione superficiale sono molto simili in entrambe le molecole, con un orientamento leggermente differente per la catena laterale dell'asparagina. Considerando che il motivo strutturale è esposto sulla superficie in entrambi gli

anticorpi e, quindi, facilmente accessibile all'ambiente e che non sembra esservi nessuna differenza significativa nel ripiegamento del motivo strutturale NG della HCDR2 in PG3055 rispetto a P3056, sarebbe considerato improbabile che l'aumentata deamidazione di Asn54 in PG3056 fosse la causa ultima della variazione di legame osservata dei differenti lotti di PG3056.

Esempio 4: generazione e caratterizzazione di varianti di PG3056

La caratterizzazione analitica di PG3056 mediante CIEX-HPLC ha mostrato che la IgG è altamente eterogenea. Poiché questa eterogeneità potrebbe ostruire la purificazione basata su CIEX-HPLC della IgG bispecifica contro CD3xCLEC12A abbiamo puntato a migliorare il profilo di CIEX-HPLC del Fab MF3056. La regione variabile della catena pesante di MF3056 contiene diversi residui e/o motivi strutturali che potrebbero contribuire all'eterogeneità di PG3056. Questi sono il residuo di lisina C-terminale, un motivo strutturale di deamidazione dell'asparagina NG nella HCDR2 ed un motivo strutturale DP labile in acidi nella HCDR3 (si veda la figura 6 per un allineamento della sequenza di MF3056_VH contro la VH3-33 della linea germinale).

Sebbene la modellazione in silico non abbia per nulla individuato il motivo strutturale NG della HCDR2 come probabile causa dell'eterogeneità osservata, si è cercato di identificare varianti della VH di MF3056 che fossero prive di questo motivo strutturale di modificazione post-traduzionale, e che in parallelo potessero mostrare un profilo di ritenzione di CIEX-HPLC migliorato, così come una stabilità migliorata. A questo scopo sono state generate e testate le seguenti varianti della VH di MF3056: MF3872, MF3873 e MF3905 (figura 7).

Questi Fab contenenti queste varianti di VH e la catena leggera comune (MF3872, MF3873 e MF3905) sono stati espressi come IgG monoclonali a lunghezza intera (PG3872, PG3873 e PG3905) e testati per il legame per CD3 espresso sulla membrana su cellule HPB-ALL mediante citometria a flusso (secondo la procedura mediante FACS come descritta precedentemente in WO 2014/051433). Sono stati ottenuti i risultati seguenti (figura 8).

Questi risultati mostrano che le varianti PG3873 e PG3905 hanno perso completamente il legame per CD3, mentre è stato mantenuto un legame per CD3 molto basso per la variante PG3872.

Come approccio alternativo per ottenere varianti

migliorate con eterogeneità ridotta ed immunogenicità ridotta, la VH di MF3056 è stata germinalizzata verso la sequenza VH3-33 in diversi residui, effettuando sostituzioni amminoacidiche singole o combinate. Sono state generate le seguenti varianti di MF3056_VH: MF3874_VH, MF3878_VH, MF3883_VH, MF3886_VH e MF3891_VH (figura 9).

Di nuovo, i Fab comprendenti queste varianti di VH e la catena leggera comune (MF3874_VH, MF3878_VH, MF3883_VH, MF3886_VH e MF3891_VH) sono stati espressi come IgG monoclonali a lunghezza intera (PG3874, PG3878, PG3883, PG3886 e PG3891) e testati per il legame per CD3 come descritto sopra. Sono stati ottenuti i risultati seguenti (figura 10).

Come mostrato nella figura 10, tutte le varianti germinalizzate singole (PG3874 (Q6E), PG3878 (V23A), PG3883 (A50V), PG3886 (T97A)) e combinate (PG3891 (Q6E/V23A/T97A)) hanno mantenuto la completa capacità di legame per CD3. Successivamente, PG3891 è stato analizzato mediante CIEX-HPLC (come descritto nell'esempio 1) per verificare se la germinalizzazione abbia causato una ridotta eterogeneità.

Come mostrato nella figura 11, il profilo di CIEX-HPLC di PG3891 ha mostrato ancora una significativa eterogeneità di carica. Simili profili di CIEX-HPLC

sono stati ottenuti per le varianti di germinalizzazione singole (dati non mostrati).

In un tentativo successivo di ridurre l'eterogeneità di carica di PG3056, sono state generate varianti di MF3056_VH prive del motivo strutturale NG della HCDR2 (figura 12).

Fab comprendenti queste varianti di VH e la catena leggera comune (MF5192-5197_VH) sono stati generati ed espressi come IgG monoclonali a lunghezza intera (numeri PG) e testati per il legame per CD3 espresso sulla membrana su cellule HPB-ALL mediante citometria a flusso, come descritto sopra. Quest'analisi (figura 13) ha mostrato che PG5196 (sostituzione di N₅₄G₅₅ con N₅₄A₅₅) ha mantenuto un legame per CD3 paragonabile al PG3056, mentre tutte le altre varianti di MF3056 testate hanno mostrato un legame per CD3 significativamente ridotto (PG5192, PG5193 o PG5197) o assente (PG5194 e PG5195).

Per valutare l'eterogeneità di carica dell'mAb PG5196, è stata eseguita la focalizzazione isoelettrica come descritto nell'esempio 1. Dopo la colorazione del gel, per PG5196 viene osservata una banda stretta a elevato pI con una banda satellite marginale ad un valore di pI alquanto superiore (si veda la figura 14).

Per valutare l'eterogeneità di carica di PG5196 in

maggior dettaglio, è stata eseguita una CIEEX-HPLC secondo la procedura descritta nell'esempio 1, ed il cromatogramma risultante viene mostrato nella figura 15. Il cromatogramma mostra un picco principale con un tempo di ritenzione di 19 minuti, preceduto da un piccolo picco a 16,9 minuti. Sorprendentemente, questi dati dimostrano che PG5196 mostra un profilo di eterogeneità di carica significativamente migliorato in confronto a PG3056.

Esempio 5: generazione di altre varianti di PG5196 utilizzando selezioni di esposizione fagica

Sulla base della VH di MF5196, sono state progettate librerie di esposizione fagica con lo scopo di ottenere altri Fab leganti CD3 con eterogeneità di carica ridotta in modo simile. Sono state generate librerie di esposizione fagica che hanno contenuto la regione VL di IGKV1-39/IGKJ1 umana riarrangiata (De Kruif et al. Biotechnol. Bioeng. 2010 (106)741-50), ed una raccolta di regioni VH basate su MF5196 incorporanti sostituzioni amminoacidiche che potrebbero potenzialmente migliorare l'interfaccia VH/VL. Le specifiche sostituzioni e gli amminoacidi alternativi permessi per posizione vengono indicati nella tabella 1. Tutte le sostituzioni indicate per posizione mutata, così come l'amminoacido originale,

sono stati introdotti in un uguale rapporto.

Tabella 1

Amminoacido e posizione in MF5196_VH	Regione	Sostituzioni introdotte per posizione
H35	FR2	FYASN
A50	FR2	ILFYNRQSK
N54	HCDR2	H
A55	HCDR2	GTN
D59	HCDR2	LIVFYRANEHST
A61	FR3	FNIHQLRYE STDKV
Y102	HCDR3	ARNDCSEQGHILKMFPSTWV
N103	HCDR3	ARDCEQGHILKMFPSTWYV
W104	HCDR3	MFYHLIV
F105	HCDR3	WMYHLIV

I batteriofagi da queste librerie di esposizione fagica sono stati selezionati in uno o due cicli utilizzando cellule HBP-ALL e/o la proteina CD3 δ ϵ -Fc umana ricombinante utilizzando procedure note ad una persona esperta nell'arte. I fagi di legame sono stati eluiti chimicamente, ed utilizzati per infettare nuovamente i batteri. Dopo la selezione di diverse colonie batteriche sopravvissute, i fagi sono stati recuperati e sono stati sottoposti ad analisi per il

legame per i complessi CD3/TCR espressi sulla superficie cellulare mediante citometria a flusso. È stata eseguita una PCR delle colonie per tutti i fagi che hanno mostrato un legame con CD3 per amplificare e sequenziare le regioni VH.

L'analisi dei geni VH ha rivelato che le varianti per sostituzione hanno mantenuto il legame per CD3. Le varianti di MF5196_VH scelte hanno presentato le seguenti sostituzioni: A50 in QSYL, D59 in LIVFRANEHST, A61 in NIHQLRYESTDKV e/o F105 in MY (tabella 2). Al contrario, le sostituzioni elencate nella tabella 1 in H35, Y102, N103 e W104 non sono state permesse poiché tutte le varianti leganti CD3 scelte hanno mantenuto l'amminoacido originale nelle posizioni 35, 102, 103 e 104. Questo dimostra che i residui H35, Y102, N103 e W104 sono amminoacidi critici per il legame con CD3.

Esempi di varianti leganti CD3 di MF5196_VH sono MF5603_VH, MF5616_VH, MF5626_VH, MF5630_VH, MF5648_VH, MF5661_VH e MF5694_VH, tutte in combinazione con la regione VL di IGKV1-39/IGKJ1 umana riarrangiata. Le sequenze VH di questi MF vengono elencate nella figura 25. Il test di queste varianti di MF in formato di IgG monospecifiche per il legame per CD3 espresso sulla membrana su cellule HPB-ALL mediante citometria a

flusso, come descritto sopra, ha mostrato che tutti questi esempi si sono legati a CD3 (figura 26). Come esempio della loro stabilità intrinseca, PG5661 è stato analizzato mediante CIEX-HPLC, eseguita secondo la procedura descritta nell'esempio 1, ed il cromatogramma risultante viene mostrato nella figura 27. Il cromatogramma mostra un picco principale con un tempo di ritenzione di ~20 minuti, simile al profilo mostrato per PG5196.

Tabella 2

Amminoacido e posizione in MF5196_VH	Sostituzioni introdotte in MF5196	Varianti di MF5196 leganti CD3 trovate con sostituzioni
A50	ILFYNRQSK	QSYL
D59	LIVFYRANEHST	LIVFRANEHST
A61	FNIHQRLRYESTDKV	NIHQRLRYESTDKV
F105	WMYHLIV	MY

Esempio 5B

Sulla base della VH di MF5196, sono state progettate librerie di esposizione fagica con lo scopo per ottenere altri Fab leganti CD3 stabili. Sono state generate librerie di esposizione fagica che hanno contenuto la regione VL di IGKV1-39/IGKJ1 umana riarrangiata (De Kruif et al. Biotechnol. Bioeng. 2010

(106)741-50) ed una raccolta di varianti di VH3-33 a cui è stata fusa la regione CDR3 della catena pesante di MF5196.

I batteriofagi da queste librerie di esposizione fagica sono stati selezionati in uno o due cicli utilizzando cellule HBP-ALL e/o la proteina CD3 δ -Fc umana ricombinante utilizzando procedure note ad una persona esperta nell'arte. I fagi di legame sono stati eluiti chimicamente ed utilizzati per infettare nuovamente i batteri. Dopo aver scelto diverse colonie batteriche sopravvissute, i fagi sono stati recuperati e sono stati sottoposti ad analisi per il legame per i complessi CD3/TCR espressi sulla superficie cellulare mediante citometria a flusso. È stata eseguita una PCR delle colonie per tutti i fagi che hanno mostrato il legame con CD3 per amplificare e sequenziare le regioni VH.

Esempi di ulteriori varianti leganti CD3 risultanti di MF5196_VH sono MF5351_VH, MF5354_VH e MF5356_VH (elencate nella figura 28), tutte in combinazione con la regione VL di IGKV1-39/IGKJ1 umana riarrangiata.

Il test di queste varianti di MF in formato di IgG monospecifiche per il legame per CD3 espresso sulla membrana su cellule HPB-ALL mediante citometria a flusso, come descritto sopra, ha mostrato che tutti

questi esempi si sono legati a CD3 (figura 29).

Esempio 6: caratterizzazione funzionale del Fab MF5196 nel formato di IgG bispecifica contro CD3xCLEC12A

Per esaminare l'attività funzionale del Fab MF5196, questo Fab contro CD3 ed il Fab MF3056 contro CD3 sono stati espressi insieme al Fab MF4327 contro CLEC12A come braccio fisso. Le IgG bispecifiche contro CD3xCLEC12A sono state espresse nel formato di IgG bispecifiche a lunghezza intera, come descritto in WO 2014/051433, comprendente l'ingegnerizzazione di cerniera inferiore/CH2 nelle posizioni 235-236 (indicate come DM-Fc, mutazione doppia di CH2 nella regione Fc). Come MF3056 e MF5196, il Fab MF4327 utilizza la catena leggera IGKV1-39/IGKJ1 umana. La sequenza del Fab MF4327 viene fornita nella domanda di brevetto WO 2014/051433. Innanzitutto, il legame del bsAb DM-Fc 5196x4327 per CD3 e CLEC12A è stato dimostrato mediante citometria a flusso utilizzando cellule HPB-ALL CD3+ e cellule HL-60 CLEC12A+ (secondo le procedure descritte precedentemente in WO 2014/051433). Il bsAb DM-Fc 3056x4327 è stato incluso come riferimento ed un controllo isotipico IgG1 non attinente, PG1337, è stato incluso come controllo (figura 16). Entrambi i bsAb DM-Fc CD3xCLEC12A si sono legati a CD3 espresso sulla membrana e HPB-ALL, con un

legame leggermente migliorato per bsAb DM-Fc 5196x4327.

In seguito, è stata testata l'attività funzionale del bsAb DM-Fc contro CD3xCLEC12A 5196x4327. Innanzitutto, è stata esaminata la capacità stimolatoria dei linfociti T con linfociti T da donatori sani a riposo. I linfociti T purificati a riposo sono stati ottenuti secondo la procedura descritta nel brevetto WO 2014/051433. I linfociti T purificati a riposo sono stati successivamente incubati con cellule da linea cellulare HL-60 derivata da leucemia in siero umano (HS) al 10% ad un rapporto cellula effettrice:bersaglio di 5:1 per due giorni, come descritto in WO 2014/051433. Il bsAb DM-Fc 3056x4327 è stato incluso come riferimento. Come IgG di riferimento di controllo negativo sono stati inclusi un controllo isotipico IgG (IgG di controllo) ed il bsAb DM-Fc 5196x1337. Il bsAb DM-Fc 5196x1337 si lega a CD3 con un braccio (MF5196) e si lega al tossoide tetanico (TT) con il secondo braccio (MF1337) ed è incluso per esaminare la potenziale attività fuori bersaglio indotta da parte di MF5196. Il bsAb e le IgG di controllo sono stati testati a 1000ng/ml. I dati di attivazione dei linfociti T vengono espressi come percentuale di cellule positive per CD69 in una

popolazione di linfociti T positiva per CD4 o positiva per CD8 (figura 17). Il bsAb DM-Fc 5196x4327 ha indotto l'attivazione dei linfociti T CD4 e CD8 come indicato dalla sovraregolazione del marcatore di attivazione precoce CD69. Anche il bsAb DM-Fc 3056x4327 ha indotto la sovraregolazione di CD69 sui linfociti T CD4 e CD8, tuttavia ad un grado inferiore rispetto al bsAb DM-Fc 5196x4327. La sovraregolazione di CD69 osservata su entrambi i sottoinsiemi di linfociti T è stata specifica per l'antigene CLEC12A poiché il bsAb DM-Fc 5196x1337 non ha indotto la sovraregolazione di CD69.

Questa analisi ha mostrato che il bsAb DM-Fc 5196x4327 ha avuto una capacità leggermente migliore di indurre l'attivazione specifica per l'antigene dei linfociti T CD4 e CD8 rispetto al bsAb DM-Fc 3056x4327 (figura 17). Il bsAb DM-Fc 5196x4327 che ha indotto l'attivazione dei linfociti T è stato specifico per CLEC12A, poiché il bsAb DM-Fc 5196x1337 di controllo non ha indotto nessuna attivazione dei linfociti T. Complessivamente, questo mostra che la sostituzione amminoacidica di N con A di HCDR2, risultante nel Fab MF5196 legante CD3, ha completamente mantenuto l'attivazione dei linfociti T specifici per CLEC12A. Per indagare se il grado di attivazione dei linfociti

T da parte del bsAb DM-Fc contro CD3xCLEC12A 5196x4327 rispetto a 3056x4327 sia stato sufficiente ad indurre la lisi delle cellule bersaglio, le cellule HL-60 sono state marcate con diacetato di carbossifluoresceina succimidil estere (CFSE) e sottoposte a co-coltura con linfociti T da donatori sani ad un rapporto cellula effettrice:bersaglio di 5:1 in presenza di HS al 10%. Il bsAb DM-Fc contro CD3xTT 5196x1337 è stato incluso esaminare la potenziale lisi fuori bersaglio. Le IgG bispecifiche sono state testate in un intervallo di diluizione di 4 volte a partire da 1000ng/ml. Dopo due giorni, le cellule HL-60 positive per CFSE sopravvissute sono state quantificate mediante citometria a flusso. I risultati sono stati espressi come percentuale di lisi specifiche rispetto alla condizione di controllo con PBS (figura 18).

Questa analisi ha mostrato che il bsAb DM-Fc 5196x4327 ha completamente conservato la capacità di indurre la lisi delle cellule bersaglio specifiche per l'antigene CLEC12A. Sorprendentemente, la potenza di DM-Fc 5196x4327 è stata significativamente migliore rispetto a quella del bsAb DM-Fc 3056x4327.

In conclusione, questo esempio ha dimostrato che il Fab MF5196 è funzionale, poiché il bsAb DM-Fc contro CD3xCLEC12A 5196x4327 ha indotto efficientemente

l'attivazione dei linfociti T specifici per l'antigene CLEC12A e la lisi di cellule HL-60 CLEC12A+. Inoltre, questo esempio ha dimostrato che il bsAb DM-Fc 5196x4327 ha una potenza migliorata in confronto al bsAb DM-Fc 3056x4327.

Esempio 7: affinità dei bracci anti-CD3 ed anti-CLEC12A di bsAb DM-Fc 5196x4327

Le affinità dei Fab MF5196 contro CD3 ed MF4327 contro CLEC12A per i loro bersagli sono state misurate mediante la tecnologia della risonanza plasmonica di superficie (SPR) utilizzando un BIAcore T100. Un anticorpo monoclonale anti-IgG umana in topo (Becton e Dickinson, numero di catalogo 555784) è stato accoppiato alle superfici di un chip sensore CM5 utilizzando una chimica ad ammine libere (NHS/EDC). Quindi, il bsAb DM-Fc 5196x4327 è stato catturato sulla superficie di questo sensore. Successivamente, gli antigeni purificati ricombinanti CLEC12A umano (Sino Biological Inc, numero di catalogo 11896-H07H) e proteina CD3 δ -Fc umana sono stati fatti correre sulla superficie del sensore in un intervallo di concentrazione per misurare le costanti di associazione e di dissociazione. Dopo ciascun ciclo, la superficie del sensore è stata rigenerata mediante un impulso di HCl ed il bsAb DM-Fc 5196x4327 è stato

catturato nuovamente. Dai sensogrammi ottenuti sono state determinate le costanti di associazione e di dissociazione utilizzando il programma BIAevaluation. Questi dati (figura 19) hanno mostrato che il bsAb DM-Fc 5196x4327 ha avuto un'affinità di 3nM per il CLEC12A umano ed un'affinità di 177nM per CD3. Questo ha mostrato che l'affinità del braccio per CLEC12A è stata ~60 volte superiore rispetto all'affinità del braccio legante il CD3 umano nel bsAb DM-Fc 5196x4327.

Tabella 3: costanti di associazione e di dissociazione e valori di affinità per il legame al CD3 umano ed al CLEC12A umano. Il valore è la media di tre misurazioni. KD: costante di affinità (dissociazione all'equilibrio).

Antigene	KD (M)
CLEC12A	3×10^{-9}
CD3 $\delta\epsilon$ -Fc	177×10^{-9}

Esempio 8: efficacia del bsAb DM-Fc 5196x4327 nell'indurre la lisi di blasti di LMA in campioni di pazienti con LMA primaria

È stato mostrato nell'esempio 6 che il bsAb DM-Fc 5196x4327 induce potentemente la lisi delle cellule bersaglio HL-60 da parte di linfociti T derivati da donatori sani. Nel brevetto WO 2014/051433 gli inventori hanno mostrato che un bsAb DM-Fc contro

CD3xCLEC12A ha avuto la capacità di indurre la lisi di blasti di LMA da parte di linfociti T derivati da pazienti con LMA autologhi ad un rapporto effettore su bersaglio di 5:1. Qui, è stata esaminata l'efficacia di un bsAb DM-Fc contro CD3xCLEC12A, più specificamente del bsAb DM-Fc contro CD3xCLEC12A 5196x4327, nell'indurre la lisi di blasti di LMA in campioni di LMA primaria con bassi rapporti effettore su bersaglio, linfocita T su blasto di LMA.

Campioni di pazienti con LMA posti a diagnosi (dalle classificazioni FAB di LMA M1, M2, M4, M4/M5, tabella 4) sono stati scongelati e caratterizzati per la frazione di linfociti T e blasti di LMA mediante analisi di citometria a flusso per CD4, CD8, CD14, CD33, CD34, CD45 e 7AAD. I campioni di LMA analizzati hanno avuto un rapporto effettore su bersaglio variabile da 1:7-1:40.

Successivamente, i campioni di midollo osseo dei pazienti con LMA primaria sono stati sottoposti a coltura in terreno IMDM arricchito con HS normale al 10% più IL-15 20ng/ml (Miltenyi, #130-095-766), GM-CSF 2,5ng/ml (Immunotools, #11343125), G-CSF 12,5ng/ml (descritto in Norde et al., 2009), IL-3 6,25ng/ml (Immunotools, #11340035), SCF 3,0ng/ml (Immunotools, #11343325) ed Flt3L 2,5ng/ml (Immunotools,

#311340035). Le condizioni testate hanno incluso PBS, Ab WT-Fc di controllo isotipico, bsAb DM-Fc 5196x4327, bsAb DM-Fc 5196x1337 ed Ab WT-Fc contro CD3 di controllo positivo (tutti gli anticorpi a 1000ng/ml). Dopo sette giorni di coltura, l'espansione dei linfociti T e l'uccisione dei blasti di LMA sono state determinate mediante analisi di citometria a flusso utilizzando gli stessi marcatori utilizzati il giorno 0. I risultati sono stati espressi come espansione dei linfociti T in numero di volte o frequenza di lisi dei blasti di LMA rispetto alla condizione con PBS.

Questi dati hanno dimostrato (tabella 4 e figura 20) che il bsAb DM-Fc 5196x4327 ha indotto efficientemente l'espansione dei linfociti T (espansione dei linfociti T di 5-30 volte) dopo 7 giorni. In maniera più importante, questi dati hanno dimostrato che il bsAb DM-Fc 5196x4327 ha indotto efficientemente la lisi (26-88%) di cellule tumorali di LMA di pazienti in 5 campioni testati di pazienti con LMA primaria su 5, perfino in campioni di LMA con rapporti molto bassi di effetto su bersaglio.

Tabella 4

Paziente numero	Rapporto E:T il giorno 0	Classificazione FAB di LMA	% di uccisione di blasti	Espansione dei linfociti T
-----------------	--------------------------	----------------------------	--------------------------	----------------------------

			(dopo 7 giorni)	in numero di volte (dopo 7 giorni)
#1	1:21	M4/M5	26%	30
#2	1:10	M4	44%	8
#3	1:7	M2	88%	4
#4	1:39	M4/M5	65%	6
#5	1:40	M1	83%	6

L'efficacia del bsAb DM-Fc 5196x4327 nell'indurre la proliferazione di linfociti T e la lisi dei blasti di LMA è stata analizzata in altri campioni di pazienti con LMA posti a diagnosi.

I campioni di pazienti con LMA posti a diagnosi (da classificazioni FAB di LMA M1, M2, M4, M4/M5, tabella 5) sono stati scongelati e caratterizzati per la frazione di linfociti T e blasti di LMA mediante analisi di citometria a flusso per CD4, CD8, CD14, CD33, CD34, CD45 e 7AAD. I campioni di LMA analizzati hanno avuto un rapporto effetto bersaglio variabile da 1:3-1:97. Successivamente, i campioni di pazienti con LMA primaria sono stati sottoposti a coltura come descritto sopra nell'esempio 8. Le condizioni testate hanno incluso PBS, Ab WT-Fc di controllo isotipico, bsAb DM-Fc 5196x4327, bsAb DM-Fc

5196x1337 ed Ab WT-Fc contro CD3 di controllo positivo (tutti gli anticorpi a 200ng/ml). Dopo sette e dieci giorni di coltura, l'espansione dei linfociti T e l'uccisione dei blasti di LMA sono state determinate mediante analisi di citometria a flusso utilizzando gli stessi marcatori utilizzati il giorno 0. I risultati sono stati espressi come espansione dei linfociti T in numero di volte o frequenza di lisi dei blasti di LMA rispetto alla condizione con PBS.

Questi dati hanno dimostrato (tabella 5) che il bsAb DM-Fc 5196x4327 ha indotto efficientemente l'espansione dei linfociti T (espansione dei linfociti T di 7-226 volte) dopo 10 giorni. In maniera più importante, questi dati hanno dimostrato che il bsAb DM-Fc 5196x4327 ha indotto efficientemente la lisi (38-99%) di cellule tumorali di LMA di pazienti in 6 campioni testati di pazienti con LMA primaria su 8, perfino in campioni di LMA con rapporti molto bassi di effettore su bersaglio di 1:45-1:97.

Tabella 5

Paziente numero	Rapporto E:T il giorno 0	Classificazione FAB di LMA	Classificazione di rischio di LMA	% di uccisione di blasti (dopo 10 giorni)	Espansione dei linfociti T in numero di

					volte (dopo 10 giorni)
#6	1:45	M1	buono	95%	20
#7	1:3	M2	buono	99%	39
#8	1:17	M2	scarso	87%	226
#9	1:94	M4	scarso	0%	7
#10	1:46	M4/M5	scarso	38%	23
#11	1:97	M4/M5	scarso	39%	55
#12	1:31	M4/M5	intermedio	0%	9
#13	1:15	M4/M5	intermedio	67%	130

Esempio 9

La calorimetria differenziale a scansione (DSC) è stata utilizzata per misurare la stabilità termica dei domini delle IgG descritti qui. Gli esperimenti di DSC sono stati eseguiti su un MicroCal VP-DSC utilizzando il programma Origin v7.0 (VPViewer e VPAnalyzer). Gli anticorpi sono stati prima dializzati contro un tampone con fosfato 10mM, NaCl 150mM a pH 6,5. I campioni di IgG sono stati analizzati ad una concentrazione proteica di 0,25mg/ml come determinato mediante assorbimento UV, ed il tampone di dialisi è stato utilizzato come campione di riferimento. Le scansioni sono state effettuate da 50°C-95°C con una

velocità di scansione di 1°C/min e sono state analizzate utilizzando i programmi GraphPad PRISM 5 e Microsoft Excel 2010.

L'analisi di DSC della IgG1 selvatica (WT) ha portato a due picchi, come mostrato nella figura 21 (indicati come WT | WT per CH2 | CH3). La Tm1 a 70,9°C corrisponde alla fusione del dominio CH2, mentre il picco a 85,0°C (Tm2) rappresenta la fusione dei Fab e del dominio CH3. Il grafico di DSC di una IgG1 con Fab identici comprendenti due mutazioni (L235G, G236R) nel dominio CH2 (DM | WT) mostra un picco Tm2 molto simile a 85,0°C. Il picco Tm1 tuttavia si è spostato a 73,5°C, indicando che queste mutazioni incrementano significativamente la stabilità del dominio CH2. Poiché il dominio CH2 non è solo il dominio più fragile di una IgG1 WT, ma anche di una IgG1 bispecifica ingegnerizzata per CH3, si può concludere che il dominio CH2 ingegnerizzato per L235G, G236R conferisce anche ulteriore stabilità agli anticorpi IgG bispecifici contro CD3xCLEC12A che recano queste mutazioni di CH2.

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo che si lega a CD3 umano, il quale anticorpo comprende una catena pesante ed una catena leggera in cui la suddetta catena pesante comprende una regione variabile che comprende la sequenza

amminoacidica:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVAS GFTFS SYGMH WVRQA PGKGL EEWAA IWYX₁X₂
RKQDY ADSVK GRFTI SRDNS KNTLY LQMNS LRAED IAVYY CTRGT GYNWF DPWGG
GTLVT VSS

con 0-5 sostituzioni amminoacidiche in una o più posizioni diverse dalla posizione indicata mediante X₁X₂ e diverse dalle regioni CDR;

in cui

X₁ = N ed X₂ = A;

X₁ = N ed X₂ = T;

X₁ = H ed X₂ = G;

X₁ = D ed X₂ = G; o

X₁ = H ed X₂ = A; e la suddetta catena leggera comprende la regione variabile della catena leggera O12/IgVk1-39 della figura 23A con 0-5 sostituzioni amminoacidiche.

2. Anticorpo della rivendicazione 1, in cui la suddetta regione variabile della catena leggera è una regione variabile O12/IgVk1-39*01 della linea germinale.

3. Anticorpo della rivendicazione 2, in cui la regione

variabile della catena leggera comprende la catena leggera kappa IgVk1-39*01/IGJk1*01 o IgVk1-39*01/IGJk5*01.

4. Anticorpo della rivendicazione 3, in cui la regione variabile della catena leggera comprende la catena leggera kappa della linea germinale IgVk1-39*01/IGJk1*01 o IgVk1-39*01/IGJk5*01.

5. Anticorpo della rivendicazione 1, in cui la suddetta regione variabile della catena leggera comprende la sequenza amminoacidica:

DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQOKP GKAPK
LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ
SYSTP PTEGQ GTKVE IK o DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA
SQSIS SYLNW YQOKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD
FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITEG QGTRL EIK con 0-5
inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni
amminoacidiche o una loro combinazione.

6. Anticorpo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5 che è un anticorpo bispecifico.

7. Anticorpo bispecifico della rivendicazione 6 comprendente una combinazione di catene H/L di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5 ed una combinazione di catene H/L che si lega ad un antigene tumorale.

8. Anticorpo bispecifico della rivendicazione 7, in cui la suddetta combinazione di catene H/L che si lega

ad un antigene tumorale si lega a CLEC12A.

9. Anticorpo o anticorpo bispecifico delle rivendicazioni 1-8 che comprendono una regione costante umana e domini variabili umani.

10. Anticorpo bispecifico di una qualsiasi delle rivendicazioni 6-9 comprendente due differenti catene pesanti immunoglobuliniche con domini di eterodimerizzazione compatibili.

11. Anticorpo bispecifico della rivendicazione 10, in cui i suddetti domini di eterodimerizzazione compatibili sono domini di eterodimerizzazione CH3 delle catene pesanti immunoglobuliniche compatibili.

12. Anticorpo bispecifico di una qualsiasi delle rivendicazioni 6-11, in cui il suddetto anticorpo bispecifico è un anticorpo IgG con un dominio CH2 e/o della cerniera inferiore mutante, in modo tale che l'interazione dell'anticorpo IgG bispecifico con un recettore per l'Fc gamma sia ridotta.

13. Anticorpo bispecifico della rivendicazione 12, in cui il dominio CH2 e/o della cerniera inferiore mutante comprende una sostituzione amminoacidica nelle posizioni 235 e/o 236 (numerazione di Kabat), preferibilmente una sostituzione L235G e/o G236R.

14. Anticorpo bispecifico di una qualsiasi delle rivendicazioni 6-12 comprendente una regione variabile

della catena leggera 012/IgVk1-39 della figura 23A con 0-5 inserzioni, delezioni, sostituzioni, addizioni amminoacidiche o una loro combinazione.

15. Anticorpo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-14 per uso nel trattamento di un soggetto che lo richiede.

* * * * *

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-000

LEGENDA DELLE TAVOLE DI DISEGNO

TAVOLA 1/17

FIGURA 1

"Figure 1" = Figura 1

"Marker" = Marcatore

FIGURA 2

"Figure 2" = Figura 2

TAVOLA 2/17

FIGURA 3

"Figure 3" = Figura 3

FIGURA 4

"Figure 4" = Figura 4

"control of IgG" = Controllo di IgG

FIGURA 5

"Figure 5" = Figura 5

TAVOLA 3/17

FIGURA 6

"Figure 6" = Figura 6

"Consensus" = Consenso

FIGURA 7

"Figure 7" = Figura 7

FIGURA 8

"Figure 8" = Figura 8

"IgG concentration" = Concentrazione di IgG

TAVOLA 4/17

FIGURA 9

"Figure 9" = Figura 9

"Consensus" = Consenso

TAVOLA 5/17

FIGURA 10

"Figure 10" = Figura 10

"IgG concentration" = Concentrazione di IgG

FIGURA 11

"Figure 11" = Figura 11

TAVOLA 6/17

FIGURA 12

"Figure 12" = Figura 12

"Consensus" = Consenso

FIGURA 13

"Figure 13" = Figura 13

"IgG concentration" = Concentrazione di IgG

"Ctrl IgG" = IgG di controllo

FIGURA 14

"Figure 14" = Figura 14

"Marker" = Marcatore

FIGURA 15

"Figure 15" = Figura 15

TAVOLA 8/17

FIGURA 16

"Figure 16" = Figura 16

FIGURA 17

"Figure 17" = Figura 17

"Ctrl IgG" = IgG di controllo

"% CD69+ CD4 cells" = % di cellule CD4 CD69+

"% CD69+ CD8 cells" = % di cellule CD8 CD69+

TAVOLA 9/17

FIGURA 18

"Figure 18" = Figura 18

"Control IgG" = IgG di controllo

"% specific lysis" = Lisi specifica %

FIGURA 19

"Figure 19" = Figura 19

"Time" = Tempo

"Response" = Risposta

"RU" = UR

TAVOLA 10/17

FIGURA 20

"Figure 20" = Figura 20

"CLEC12A expression" = Espressione di CLEC12A

"Isotype" = Isotipo

FIGURA 21

"Figure 21" = Figura 21

"Temperature" = Temperatura

"Sample" = Campione

TAVOLA 11/17

FIGURA 22

"Figure 22" = Figura 22

FIGURA 23

"Figure 23" = Figura 23

FIGURA 24

"Figure 24" = Figura 24

TAVOLA 12/17

FIGURA 25

"Figure 25" = Figura 25

"Consensus" = Consenso

TAVOLA 14/17

FIGURA 26

"Figure 26" = Figura 26

"IgG conc" = Concentrazione di IgG

"Control IgG" = IgG di controllo

TAVOLA 15/17

FIGURA 27

"Figure 27" = Figura 27

"WVL" = Lunghezza d'onda

TAVOLA 16/17

FIGURA 28

"Figure 28" = Figura 28

"Consensus" = Consenso

TAVOLA 17/17

FIGURA 29

"Figure 29" = Figura 29

"IgG conc" = Concentrazione di IgG

"Control IgG" = IgG di controllo

* * * * *

Si attesta la perfetta conformità della
traduzione che precede.

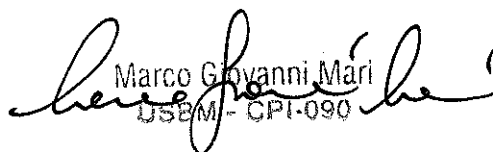

Marco Giovanni Mari
USEM - CPI-090

Figure 1

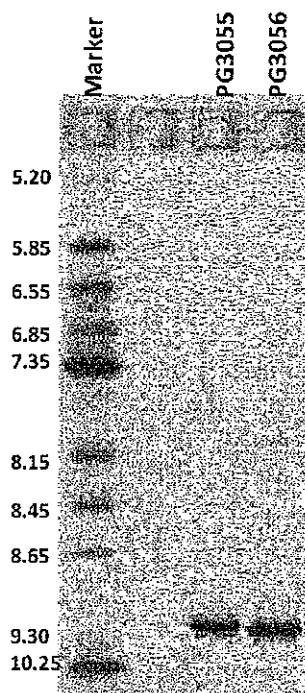
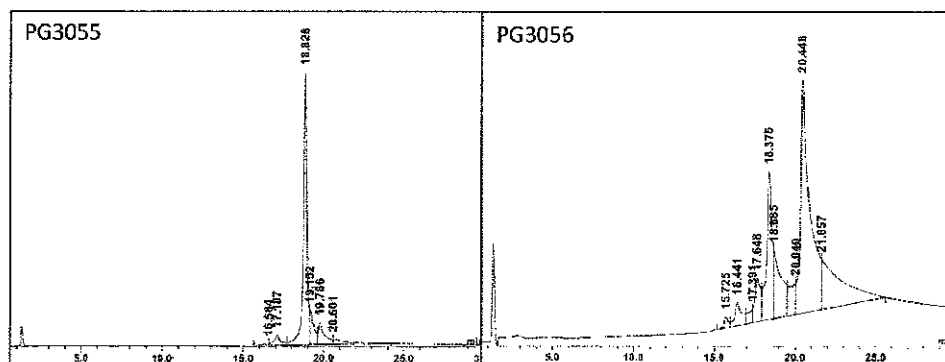


Figure 2



Marco Giovanni Mari
USDM - CPT-090

Figure 6

		1		50
3-33_VH	(1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS	CAASGFTFSSYGMHWRQAPGK	GLEWVAV
MF3056_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLS	CVASGFTFSSYGMHWRQAPGK	GLEWVAA
Consensus	(1)	QVQLV SGGGVVQPGRSLRLS	ASGFTFSSYGMHWRQAPGK	GLEWVA
		51		100
3-33_VH	(51)	IWYDGSNKYYADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR--
MF3056_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCTRGT
Consensus	(51)	IWY G YADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYC R
		101	115	
3-33_VH	(99)	-----		
MF3056_VH	(101)	GYNWFDPWQGGLVT		
Consensus	(101)			

Figure 7

		1		50
MF3056_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLS	CVASGFTFSSYGMHWRQAPGK	GLEWVAA
MF3872_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLS	CVASGFTFSSYGMHWRQAPGK	GLEWVAA
MF3873_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLS	CVASGFTFSSYGMHWRQAPGK	GLEWVAA
MF3905_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLS	CVASGFTFSSYGMHWRQAPGK	GLEWVAA
		51		100
MF3056_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCTRGT
MF3872_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCTRGT
MF3873_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCTRGT
MF3905_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCTRGT
		101	118	
MF3056_VH	(101)	GYNWFDPWQGGLVTVSS		
MF3872_VH	(101)	GYNWFDPWQGGLVTVSS		
MF3873_VH	(101)	GYNWFDPWQGGLVTVSS		
MF3905_VH	(101)	GYNWFDPWQGGLVTVSS		

Figure 8

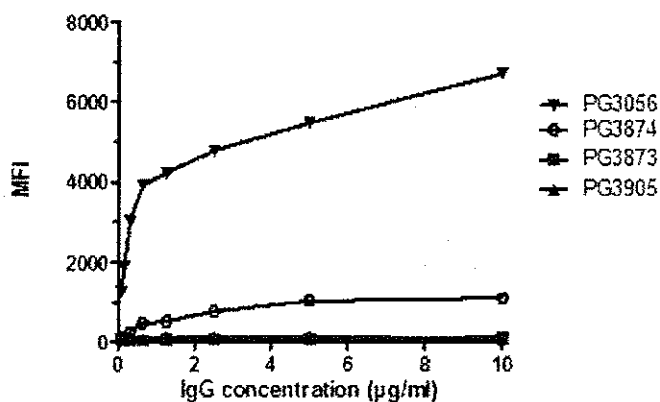


Figure 9

		1		50
MF3056_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA		
MF3874_VH	(1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA		
MF3878_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA		
MF3883_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV		
MF3886_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA		
MF3891_VH	(1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA		
Consensus	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA		
		51		100
MF3056_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT		
MF3874_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT		
MF3878_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT		
MF3883_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT		
MF3886_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGT		
MF3891_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGT		
Consensus	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT		
		101		118
MF3056_VH	(101)	GYNWFDPWGQGITLVTVSS		
MF3874_VH	(101)	GYNWFDPWGQGITLVTVSS		
MF3878_VH	(101)	GYNWFDPWGQGITLVTVSS		
MF3883_VH	(101)	GYNWFDPWGQGITLVTVSS		
MF3886_VH	(101)	GYNWFDPWGQGITLVTVSS		
MF3891_VH	(101)	GYNWFDPWGQGITLVTVSS		
Consensus	(101)	GYNWFDPWGQGITLVTVSS		

Figure 10

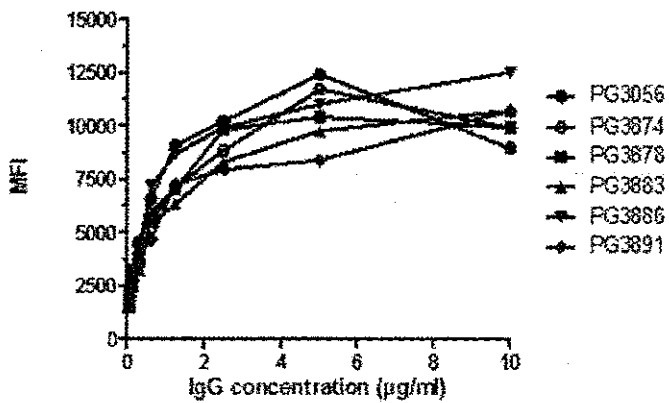


Figure 11

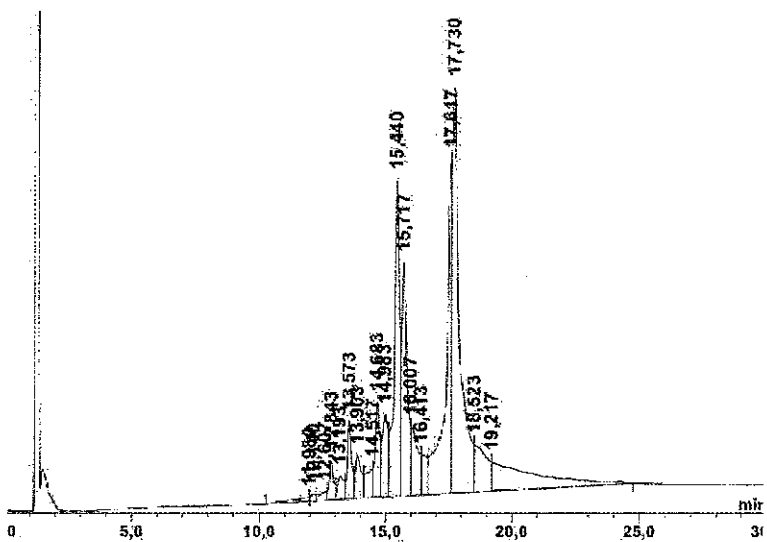


Figure 12

	1	50
MF3056_VH	(1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
MF5192_VH	(1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
MF5193_VH	(1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
MF5194_VH	(1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
MF5195_VH	(1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
MF5196_VH	(1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
MF5197_VH	(1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
Consensus	(1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
	51	100
MF3056_VH	(51) IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
MF5192_VH	(51) IWYHGRKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
MF5193_VH	(51) IWYHARKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
MF5194_VH	(51) IWYHTRKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
MF5195_VH	(51) IWYHNRKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
MF5196_VH	(51) IWYNARKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
MF5197_VH	(51) IWYNTRKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
Consensus	(51) IWYHARKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
	101	118
MF3056_VH	(101) GYNWFDPWGQGLVTVSS	
MF5192_VH	(101) GYNWFDPWGQGLVTVSS	
MF5193_VH	(101) GYNWFDPWGQGLVTVSS	
MF5194_VH	(101) GYNWFDPWGQGLVTVSS	
MF5195_VH	(101) GYNWFDPWGQGLVTVSS	
MF5196_VH	(101) GYNWFDPWGQGLVTVSS	
MF5197_VH	(101) GYNWFDPWGQGLVTVSS	
Consensus	(101) GYNWFDPWGQGLVTVSS	

Figure 13

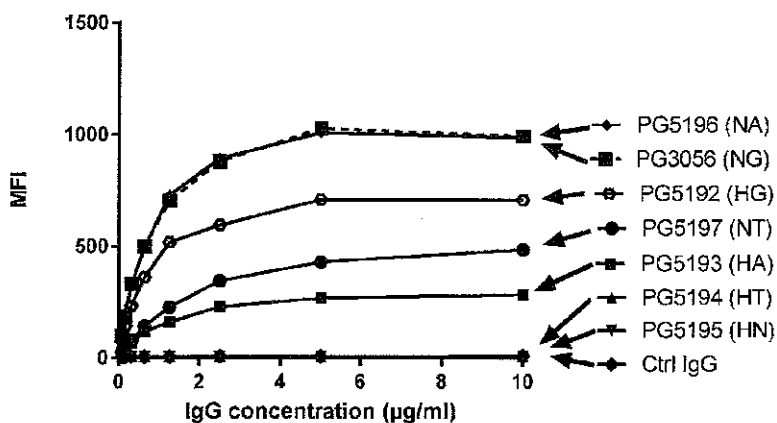


Figure 14

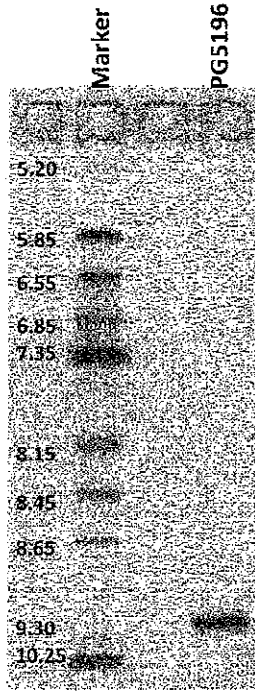
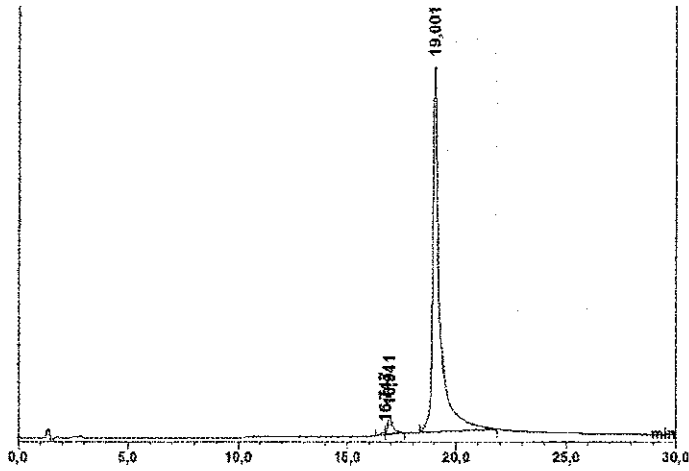


Figure 15



Marco Giovanni Mari
USP# 271090

Figure 16

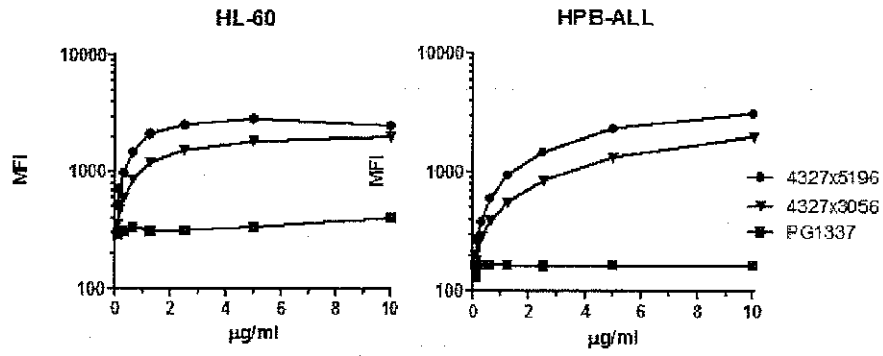


Figure 17

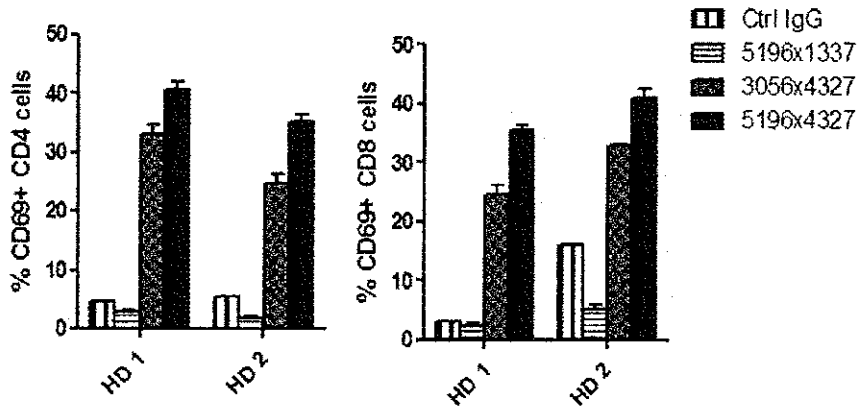


Figure 18

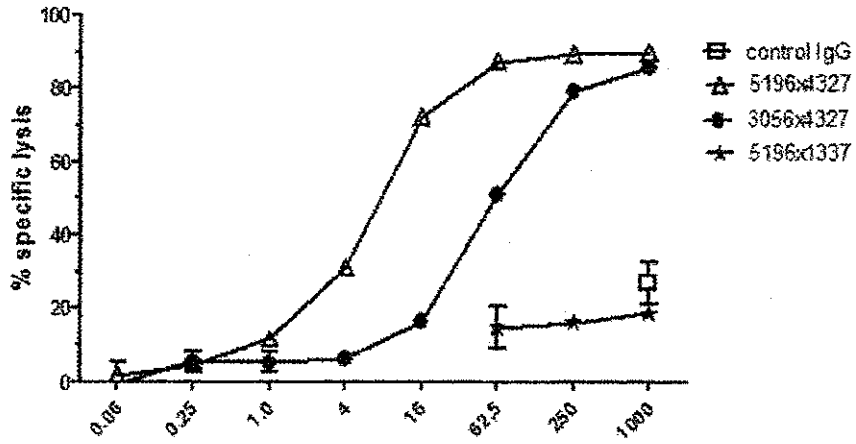


Figure 19

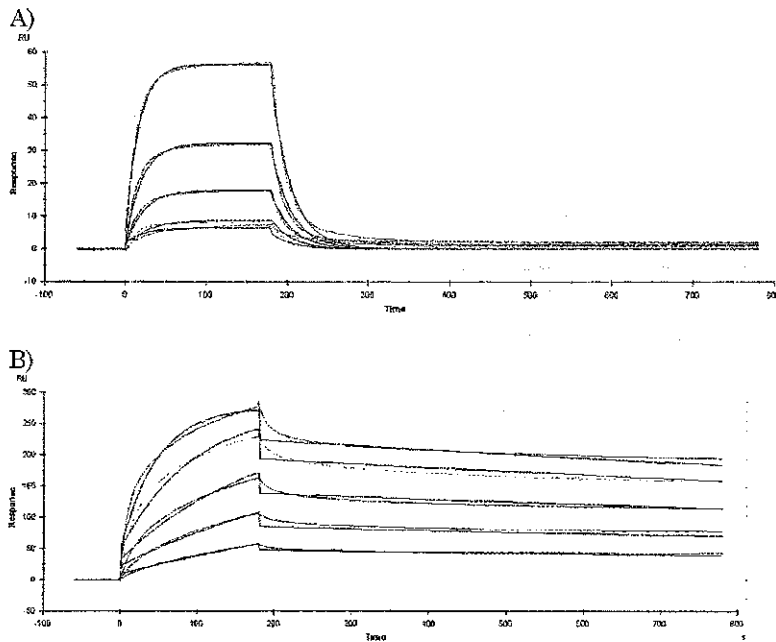


Figure 20

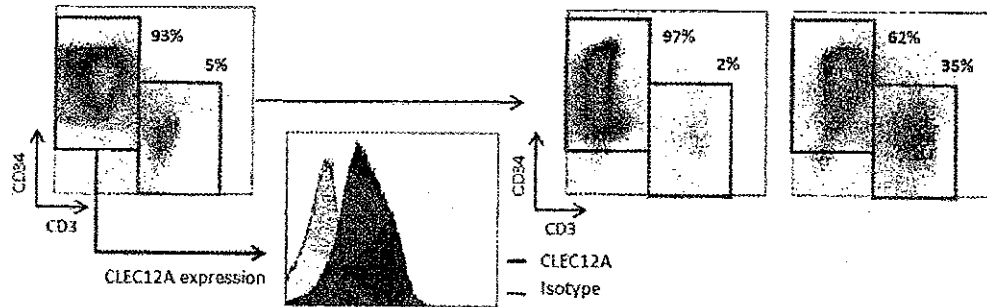
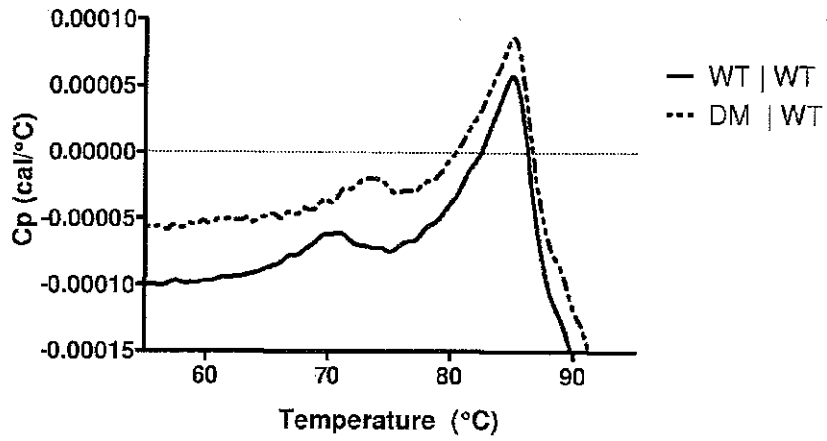


Figure 21



Sample	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
WT WT	70.9	85.0
DM WT	73.5	85.0

Figure 22

15C3 VH (MF3055_VH)
QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNGRKQDYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGLVTVSS

15C3 VL1 - IGKV3-11*
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAITGIPASFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPWTFGQGTKVEIK

15C3 VL2 - IGKV1-13 (MF3055_VL)
AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPIITFGQGTREIK

IGKV1-39 (MF3056_VL)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

Figure 23

Figure 23A
IGKV1-39A

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

Figure 23B
IGKV1-39/jk1

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

Figure 23C
IGKV1-39/jk5

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTREIK

Figure 24

MF1337_VH

EVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASDYIFTKYDINWVRQAPGQGLEWVGWMSANTGNIGYAQKFKQGRVTM
TRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGTITVTVSS

MF4327_VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWVGIINPSSGTSYAQKFKQGRVTM
TRDTSSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAKGTGDFWFDYWGQGLVTVSS


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

Figure 25

	1	50
MF5196_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5603_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5616_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5626_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5630_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5648_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5661_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5694_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
Consensus	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
	51	100
MF5196_VH	(51)	IWYNARKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5603_VH	(51)	IWYNARKQEYIDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5616_VH	(51)	IWYNARKQEYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5626_VH	(51)	IWYNARKQEYRDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5630_VH	(51)	IWYNARKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5648_VH	(51)	IWYNARKQEYLD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5661_VH	(51)	IWYNARKQEYSDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5694_VH	(51)	IWYNARKQEYSDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
Consensus	(51)	IWYNARKQEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
	101	118
MF5196_VH	(101)	GYNWFDPWGQGT LVTIVSS
MF5603_VH	(101)	GYNWFDPWGQGT LVTIVSS
MF5616_VH	(101)	GYNWFDPWGQGT LVTIVSS
MF5626_VH	(101)	GYNWFDPWGQGT LVTIVSS
MF5630_VH	(101)	GYNWYDPWGQGT LVTIVSS
MF5648_VH	(101)	GYNWFDPWGQGT LVTIVSS
MF5661_VH	(101)	GYNWFDPWGQGT LVTIVSS
MF5694_VH	(101)	GYNWFDPWGQGT LVTIVSS
Consensus	(101)	GYNWFDPWGQGT LVTIVSS

MF5196_VH QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNARKQDYA
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGT LVTIVSS

MF5603_VH
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNARKQEYIDSVKGRFTI
SRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGT LVTIVSS

MF5616_VH
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNARKQEYND SVKGRFTI
SRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGT LVTIVSS

MF5626_VH
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNARKQEYRDSVKGRFTI
SRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGT LVTIVSS

MF5630_VH
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNARKQDYADSVKGRFTI
SRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWYDPWGQGT LVTIVSS

MF5648_VH
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNARKQEYLD SVKGRFTI
SRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGT LVTIVSS

MF5661_VH

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAQIWYNARKQEYSDSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTYNWFDPWGQGTLVTVSS

MF5694_VH

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQEYSDSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTYNWFDPWGQGTLVTVSS

Figure 26

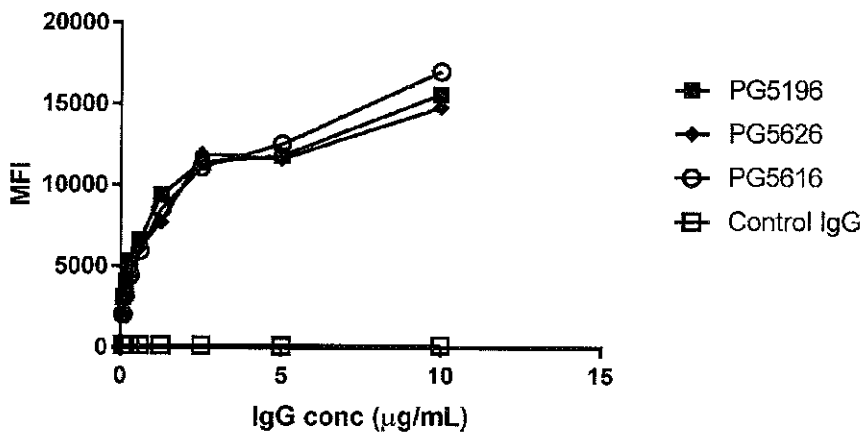
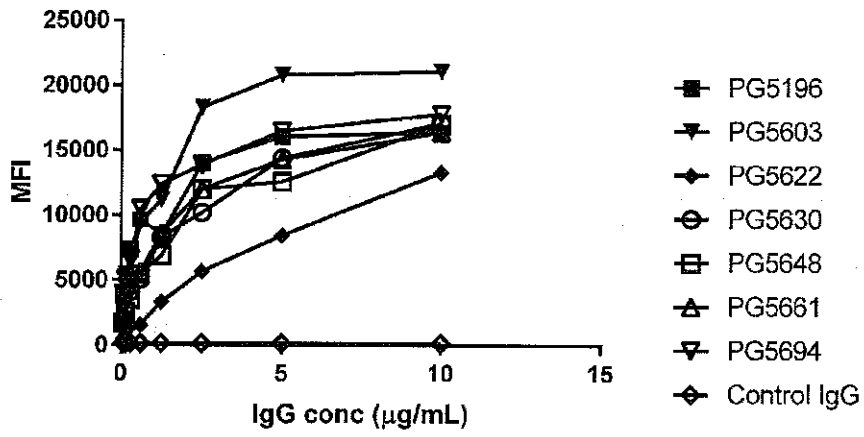
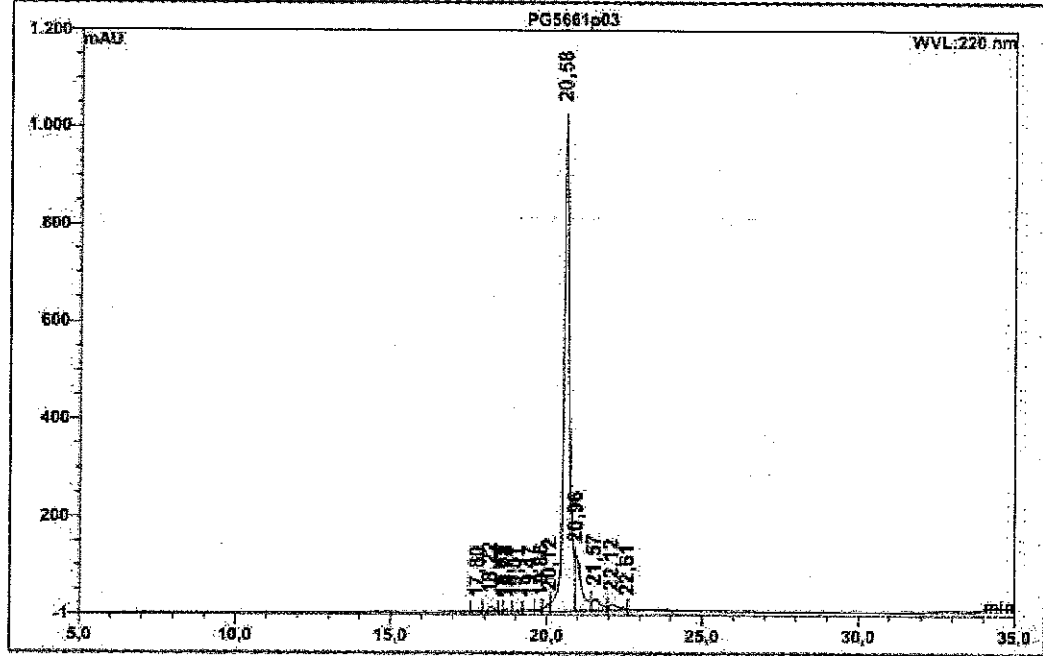


Figure 27



Marco Giovanni Mari
OSBM - CPT-090

Figure 28

	1	50
MF5196	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5351	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAM
MF5354	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAQ
MF5356	(1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSKYGMHWVRQAPGKGLEWVAQ
Consensus	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAQ
	51	100
MF5196	(51)	IWYNARKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF5351	(51)	IWYDGNKNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF5354	(51)	IYYDGSRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF5356	(51)	IWHDGRKTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
Consensus	(51)	IWYDGRKTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
	101	118
MF5196	(101)	GYNWFDPWGQGTILVTVSS
MF5351	(101)	GYNWFDPWGQGTILVTVSS
MF5354	(101)	GYNWFDPWGQGTILVTVSS
MF5356	(101)	GYNWFDPWGQGTILVTVSS
Consensus	(101)	GYNWFDPWGQGTILVTVSS

MF5351_VH

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAMIWYDGNKNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGTILVTVSS

MF5354_VH

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAQIYYDGSRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGTILVTVSS

MF5356_VH

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSKYGMHWVRQAPGKGLEWVAQIWHDGRKTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGTILVTVSS

Figure 29

