

DIACUERPOS ENLAZADOS COVALENTEMENTE QUE TIENEN
INMUNOREACTIVIDAD CON PD-1 Y LAG-3, Y MÉTODOS DE USO DE LOS
MISMOS

5 **Referencia Cruzada a Solicitudes Relacionadas:**

[0001] Esta solicitud reclama la prioridad para la
Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 62/017,467
(presentada el 26 de junio de 2014; pendiente), cuya
solicitud se incorpora en la presente para referencia en su
10 totalidad.

Referencia al Listado de Secuencia:

[0002] Esta solicitud incluye uno o más Listados de
Secuencias de conformidad con 37 C.F.R. 1.821 et seq., los
15 cuales se describen en medios legibles por computadora
(nombre del archivo: 1301_0115PCT_Sequence_Listing_ST25.txt,
creado el 2 de junio de 2015, y que tiene un tamaño de 50,015
bytes), cuyo archivo se incorpora en la presente para
referencia en su totalidad.

20

Antecedentes de la Invención:

Campo de la Invención:

[0003] La presente invención se dirige a diacuerpos
bienespecíficos que comprenden dos o más cadenas de
25 polipéptidos y los cuales poseen al menos un Sitio de Unión

de Epítopo que es inmunoespecífico para un epítopo de PD-1 y al menos un Sitio de Unión de Epítopo que es inmunoespecífico para un epítopo de LAG-3 (es decir, un "diacuerpo biespecífico de PD-1 x LAG-3"). De mayor preferencia, la presente invención se dirige a diacuerpos biespecíficos que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos y las cuales poseen dos Sitios de Unión de Epítopo que son inmunoespecíficos para uno (o dos) epítopos de PD-1 y dos Sitios de Unión de Epítopo que son inmunoespecíficos para uno (o dos) epítopos de 3 LAG-3 (es decir, un "diacuerpo tetravalente, biespecífico de PD-1 x LAG-3"). La presente invención también se dirige a tales diacuerpos que comprenden adicionalmente un Dominio de Fc de inmunoglobulina ("diacuerpos de Fc biespecíficos" y "diacuerpos de Fc tetravalentes, biespecíficos"). Los diacuerpos de la presente invención son capaces de unirse simultáneamente a PD-1 y a LAG-3; particularmente tales moléculas se disponen sobre las superficies de las células humanas. La invención se dirige a composiciones farmacéuticas que contienen tales diacuerpos, y a métodos que implican el uso de tales diacuerpos en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades y padecimientos.

Descripción de la Técnica Relacionada:

I. Respuesta Inmune Mediada por Células

25 [0004] El sistema inmune de humanos y otros mamíferos es

responsable de proporcionar protección contra infección y enfermedad. Tal protección se proporciona tanto por una respuesta humoral como por una respuesta inmune mediada por células. La respuesta humoral resulta en la producción de anticuerpos y otras biomoléculas que son capaces de reconocer y neutralizar objetivos extraños (antígenos). En contraste, las respuesta inmune mediada por células implica la activación de macrófagos, las células Exterminadoras Naturales (NK), y los linfocitos T citotóxicos específicos de un antígeno por células T, y la liberación de varias citocinas en respuesta al reconocimiento de antígeno (Dong, C. et al. (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*", Immunolog. Res. 28(1):39-48).

[0005] La capacidad de las células T para mediar de manera óptima una respuesta inmune contra un antígeno requiere dos interacciones de señalización distintas (Viglietta, V. et al. (2007) "*Modulating Co-Stimulation*", Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy*", Adv. Immunol. 90:297-339). En primer lugar, el antígeno que se ha dispuesto sobre la superficie de las Células Presentadoras de Antígeno (APC) deben estar presentes en una célula T CD4⁺ indiferenciada específica de antígeno. Tal presentación suministra una señal mediante el Receptor de Células T (TCR) que dirige la célula T para iniciar una respuesta inmune que será específica para el

antígeno presentado. En segundo lugar, una serie de señales co-estimuladoras e inhibidoras, mediadas a través de interacciones entre APC y distintas moléculas superficiales de célula T, provoca primero la activación y proliferación de las células T y finalmente su inhibición. De esta manera, la primera señal confiere especificidad a la respuesta inmune mientras que la segunda señal sirve para determinar la naturaleza, magnitud y duración de la respuesta.

[0006] El sistema inmune se controla estrechamente por ligandos co-estimuladores y co-inhibidores y receptores. Estas moléculas proporcionan la segunda señal para activación de células T y proporcionan una red equilibrada de señales positivas y negativas para maximizar la respuesta inmune contra la infección mientras que limita la inmunidad para sí misma (Wang, L. et al. (March 7, 2011) "*VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses*", J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. et al. (2008) "*The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections*", Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288). De importancia particular es la unión entre los ligandos B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) de la Célula Presentadora de Antígeno y los receptores CD28 y CTLA-4 del linfocito T CD4⁺ T (Sharpe, A.H. et al. (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*", Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Dong, C. et al. (2003) "*Immune Regulation by Novel*

Costimulatory Molecules", Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation", Immunol. Rev. 229:307-321). La unión de B7.1 o de B7.2 a CD28 estimula la

5 activación de células T; la unión de B7.1 o B7.2 a CTLA-4 inhibe tal activación (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation", Immunol.

10 Rev. 229:307-321; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited", Ann. Rev. Immunol. 23:515-548). CD28 se expresa constitutivamente sobre la superficie de células T (Gross, J., et al. (1992) "Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse", J. Immunol.

15 149:380-388), mientras que la expresión de CTLA4 se supra-regula rápidamente después de la activación de las células T (Linsley, P. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement", Immunity 4:535-543). Puesto que CTLA4 es el mayor receptor de

20 afinidad (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", Nature Rev. Immunol. 2:116-126), de unión, primero inicia la proliferación de células T (mediante CD28) y después la inhibe (mediante la expresión naciente de CTLA4), amortiguando por consiguiente el efecto cuando ya no

25 es necesaria la proliferación.

[0007] Investigaciones adicionales en los ligandos del receptor CD28 han conducido a la identificación y caracterización de un conjunto de moléculas B7 relacionadas (la "Superfamilia B7") (Coyle, A.J. et al. (2001) "The

5 *Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T-Cell Function*", Nature Immunol. 2(3):203-209; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited", Ann. Rev.

10 Immunol. 23:515-548; Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands", Genome Biol. 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004) "Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T-Cells." Arthritis Res. Ther. 6:208-214; Korman, A.J. et al. (2007)

15 "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy", Adv. Immunol. 90:297-339; Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity", J. Immunother. 30(3):251-260; Agarwal, A. et al. (2008) "The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance",

20 Curr. Opin. Organ Transplant. 13:366-372; Lenschow, D.J. et al. (1996) "CD28/B7 System of T-Cell Costimulation", Ann. Rev. Immunol. 14:233-258; Wang, S. et al. (2004) "Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses", Microbes

25 Infect. 6:759-766). Existen actualmente varios miembros

conocidos de la familia: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), el ligando co-estimulador inducible (ICOS-L), el ligando de muerte programada-1 (PD-1; B7-H1), el ligando de muerte programada-2 (PD-2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 y B7-H6 (Collins, M. et al. (2005) "*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*", Genome Biol. 6:223.1-223.7; Flajnik, M.F. et al. (2012) "*Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC*", Immunogenetics epub doi.org/10.1007/s00251-012-0616-2).

II. PD-1

[0008] Muerte Programada-1 ("PD-1") es un miembro de proteína de membrana de tipo I de aproximadamente 31 kD de la familia CD28/CTLA4 extendida de reguladores de células T que regulan ampliamente en forma negativa las respuestas inmunes (Ishida, Y. et al. (1992) "*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*", EMBO J. 11:3887-3895; Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2007/0202100; 2008/0311117; 2009/00110667; Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,808,710; 7,101,550; 7,488,802; 7,635,757; 7,722,868; Publicación de PCT No. WO 01/14557). Comparadas con CTLA4, más PD-1.

[0009] PD-1 se expresa en células T activas, células B y

monocitos (Agata, Y. et al. (1996) "*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes*", Int. Immunol. 8(5):765-772; Yamazaki, T. et al. (2002) "*Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC*", J. Immunol. 169:5538-5545) y en bajos niveles en células T Exterminadoras Naturales (NK) (Nishimura, H. et al. (2000) "*Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice*", J. Exp. Med. 191:891-898; Martin-Orozco, N. et al. (2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*", Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298).

[0010] La región extracelular de PD-1 consiste de un dominio de inmunoglobulina (Ig)V simple con 23% de identidad para el dominio equivalente en CTLA4 (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*", Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298). El dominio IgV extracelular es seguido por una región de transmembrana y una cola intracelular. La cola intracelular contiene dos sitios de fosforilación ubicados en un motive inhibidor a base de tirosina inmunoreceptor y un motivo interruptor a base de tirosina inmunoreceptor, sugiere que PD-1 regule negativamente las señales de TCR (Ishida, Y. et al. (1992) "*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*", EMBO J. 11:3887-3895; Blank, C. et al. (Epub 2006 Dec 29)

"Contribution Of The PD-1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer", Immunol. Immunother. 56(5):739-745).

[0011] PD-1 media su inhibición del sistema inmune por la
 5 unión a B7-H1 y B7-DC (Flies, D.B. et al. (2007) *"The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity"*, J. Immunother. 30(3):251-260; Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,803,192; 7,794,710; Publicaciones de Solicitudes de Patentes de los Estados Unidos Nos. 2005/0059051;
 10 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0313687; Publicación de PCT No. WO 01/39722; WO 02/086083).

[0012] B7-H1 y B7-DC son ligandos de unión que se expresan ampliamente sobre las superficies de tejidos de humano y murino, tal como corazón, placenta, músculo, hígado fetal,
 15 bazo, nodos linfáticos y timo, así como también hígado de murino, pulmón, riñón, células de islote del páncreas y del intestino delgado (Martin-Orozco, N. et al. (2007) *"Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity"*, Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298). En humanos, la expresión de la
 20 proteína B7-H1 se ha encontrado en las células endoteliales humanas (Chen, Y. et al. (2005) *"Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells,"* Nephron. Exp. Nephrol. 102:e81-e92; de Haij, S. et al. (2005) *"Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1"* Kidney Int. 68:2091-2102; Mazanet, M.M. et al.
 25

(2002) "B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis", J. Immunol. 169:3581-3588), miocardio (Brown, J.A. et al. (2003) "Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell
 5 Activation And Cytokine Production", J. Immunol. 170:1257-1266), sinciciotrofoblastos (Petroff, M.G. et al. (2002) "B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface", Placenta 23:S95-S101). Las moléculas también se expresan por macrófagos residentes de algunos
 10 tejidos, por macrófagos que se han activado con interferón (IFN)- γ o factor de necrosis tumoral (TNF)- α (Latchman, Y. et al. (2001) "PD-12 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation", Nat. Immunol 2:261 - 268), y en tumores (Dong, H. (2003) "B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion
 15 Of Tumor Immunity", J. Mol. Med. 81:281-287).

[0013] La interacción entre B7-H1 y PD-1 se ha encontrado que proporciona una señal co-estimuladora negativa crucial para células T y B (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity", Semin.
 20 Cancer Biol. 17(4):288-298) y funciones como un inductor de muerte celular (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death", EMBO J. 11:3887-3895; Subudhi, S.K. et al. (2005) "The Balance Of Immune
 25 Responses: Costimulation Verse Coinhibition", J. Molec. Med.

83:193-202). Más específicamente, la interacción entre bajas concentraciones del receptor de PD-1 y el ligando B7-H1 se ha encontrado que resulta en la transmisión de una señal inhibidora que inhibe fuertemente la proliferación de células T CD8⁺ específicas de antígeno; en mayores concentraciones las interacciones con PD-1 no inhibe la proliferación de células T pero reduce notablemente la producción de citocinas múltiples (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", Nature Rev. Immunol. 2:116-126). La proliferación de células T y la producción de citocinas por ambas células T CD4 y CD8 en reposo y brevemente activadas, e incluso células T diferenciadas de sangre del cordón umbilical, se ha encontrado que se inhiben por proteínas de fusión B7-H1-Fc solubles (Freeman, G.J. et al. (2000) "Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation", J. Exp. Med. 192:1-9; Latchman, Y. et al. (2001) "PD-12 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation", Nature Immunol. 2:261-268; Carter, L. et al. (2002) "PD-1:PD-1 inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T-cells and is overcome by IL-2", Eur. J. Immunol. 32(3):634-643; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", Nature Rev. Immunol. 2:116-126).

[0014] El papel de B7-H1 y PD-1 en inhibir la activación y proliferación de células T, ha sugerido que estas

biomoléculas puedan servir como objetivos terapéuticos para tratamientos de inflamación y cáncer. De esta manera, se ha propuesto el uso de anticuerpos anti-PD-1 para tratar infecciones y tumores y supra-modular una respuesta inmune adaptativa (véanse, Publicaciones de Solicitudes de Patentes de los Estados Unidos Nos. 2010/0040614; 2010/0028330; 2004/0241745; 2008/0311117; 2009/0217401; Patentes de los Estados Unidos Nos. 7,521,051; 7,563,869; 7,595,048; Publicaciones de PCT Nos. WO 2004/056875; WO 2008/083174).

Los anticuerpos capaces de unirse inmunoespecíficamente a PD-1 se han reportado por Agata, T. et al. (1996) "*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes*", Int. Immunol. 8(5):765- 772 and Berger, R. et al. (2008) "*Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies*", Clin. Cancer Res. 14(10):3044-3051 (véanse, también, Patentes de los Estados Unidos No. 8,008,449 y 8,552,154; Publicaciones de Patente de E.U. Nos. 2007/0166281; 2012/0114648; 2012/0114649; 2013/0017199; 2013/0230514 y 2014/004473 8; y Publicaciones de Patente PCT WO 2003/099196; WO 2004/004771; WO 2004/056875; WO 2004/072286; WO 2006/121168; WO 2007/005874; WO 2008/083174; WO 2009/014708; WO 2009/073533; WO 2012/135408, WO 2012/145549 y WO 2013/014668).

III. LAG-3

- [0015] El gen de activación por linfocito 3 (LAG-3, CD223) es una proteína receptora de superficie celular que se expresa por células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas y células NK, y se
5 expresa constitutivamente por células dendríticas plasmacitoides; LAG-3 no se expresa por células B, monocitos u otros tipos de células probadas (Workman, C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis", J. Immunol. 182(4): 1885-1891).
- 10 [0016] LAG-3 se ha encontrado que se encuentra estrechamente relacionado con CD4 co-receptor de células T (Grosso, J.F. et al. (2009) "Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated and Chronically Stimulated CD8 T-Cells ", J. Immunol. 182(11):6659-6669; Huang, C.T. et al.
15 (2004) "Role Of LAG-3 In Regulatory T-Cells", Immunity 21:503-513; Workman, C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis", J. Immunol. 182(4): 1885-1891). Como CD4, LAG-3 también se une a las moléculas de clase II MHC pero sí con afinidad significativamente mayor
20 (Workman, C.J. et al. (2002) "Phenotypic Analysis Of The Murine CD4-Related Glycoprotein, CD223 (LAG-3)", Eur. J. Immunol. 32:2255-2263; Huard, B. et al. (1995) "CD4/Major Histocompatibility Complex Class II Interaction Analyzed With CD4- And Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3)-Ig Fusion
25 Proteins", Eur. J. Immunol. 25:2718-2721; Huard, B. et al.

(1994) "Cellular Expression And Tissue Distribution Of The Human LAG-3- Encoded Protein, An MHC Class II Ligand", Immunogenetics 39:213-217).

[0017] Los estudios han mostrado que LAG-3 juega un papel importante en regular negativamente la proliferación, función y homeostasis de células T (Workman, C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis", J. Immunol. 182(4): 1885-1891; Workman, C.J. et al. (2002) "Cutting Edge: Molecular Analysis Of The Negative Regulatory Function Of Lymphocyte Activation Gene-3", J. Immunol. 169:5392-5395; Workman, C.J. et al. (2003) "The CD4-Related Molecule, LAG-3 (CD223), Regulates The Expansion Of Activated T- Cells", Eur. J. Immunol. 33:970-979; Workman, C.J. (2005) "Negative Regulation Of T-Cell Homeostasis By Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223)", J. Immunol. 174:688-695; Hannier, S. et al. (1998) "CD3/TCR Complex-Associated Lymphocyte Activation Gene-3 Molecules Inhibit CD3/TCR Signaling", J. Immunol. 161:4058-4065; Huard, B. et al. (1994) "Lymphocyte-Activation Gene 3/Major Histocompatibility Complex Class II Interaction Modulates The Antigenic Response Of CD4⁺ T Lymphocytes", Eur. J. Immunol. 24:3216- 3221).

[0018] Estudios han sugerido que inhibir la función de LAG-3 a través del bloqueo de anticuerpos puede invertir la inhibición del sistema inmune mediado por LAG-3 y restaurar parcialmente la función efectora (Grosso, J.F. et al. (2009)

"Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated
 and Chronically Stimulated CD8 T-Cells", J. Immunol.
 182(11):6659-6669; Grosso, J.F. et al. (2007) "LAG-3
 Regulates CD8⁺ T-Cell Accumulation And Effector Function
 5 During Self And Tumor Tolerance", J. Clin. Invest. 117:3383-
 3392). LAG-3 se ha encontrado que regula negativamente la
 expansión de células T mediante la inhibición del Receptor de
 Células T (TCR) -inducido por flujos de calcio, y controla el
 tamaño del grupo de células T de la memoria (Matsuzaki, J. et
 10 al. (2010) "Tumor-Infiltrating NY-ESO-1-Specific CD8⁺ T-Cells
 Are Negatively Regulated By LAG-3 And PD-1 In Human Ovarian
 Cancer", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 107(17):7875-7880;
 Workman C.J., et al. (2004) "Lymphocyte Activation Gene-3
 (CD223) Regulates The Size Of The Expanding T-Cell Population
 15 Following Antigen Activation in vivo", J. Immunol. 172:5450-
 5455).

[0019] Dados los avances anteriores, sigue existiendo la
 necesidad de composiciones mejoradas capaces de dirigir más
 vigorosamente el sistema inmune del cuerpo para atacar
 20 células cancerígenas o células infectadas por patógeno,
 especialmente en menores concentraciones terapéuticas. Aunque
 para el sistema inmune adaptativo puede ser un mecanismo de
 defensa potente contra cáncer y enfermedad, a menudo se ve
 obstaculizada por los mecanismos inmunosupresores en el
 25 microambiente tumoral, tal como la expresión de PD-1 y LAG-3.

Las moléculas co-inhibidoras expresadas por las células tumorales, las células inmunes y las células estromales en ambiente tumoral pueden atenuar predominantemente las respuestas de células T contra las células cancerígenas.

5 **[0020]** Como se describe en detalle en lo siguiente, la presente invención enfrenta esta necesidad al proporcionar diacuerpos tetravalentes, biespecíficos PD-1 x LAG-3. Tales diacuerpos son capaces de unirse a las moléculas de superficie de células PD-1 y LAG-3 que se encuentran presente
10 sobre las superficies de los linfocitos que infiltran el tumor exhausto y tolerante, y de alterar por consiguiente la capacidad de las moléculas superficiales celulares de unirse a sus ligandos receptores. Como tales diacuerpos biespecíficos PD-1 X LAG-3 de la presente invención actúan para bloquear la
15 inhibición el sistema inmune mediada por PD-1 y LAG-3, y promover por consiguiente la activación continua del sistema inmune. Este atributo permite que tales diacuerpos biespecíficos tengan utilidad en el tratamiento de cáncer y de enfermedades y padecimientos asociados con patógeno. La
20 invención se dirige a tales diacuerpos y a métodos para su uso.

Breve Descripción de las Figuras:

[0021] La **Figura 1** muestra una representación diagramática de los Dominios de un DART® básico.

25 **[0022]** La **Figura 2** muestra una representación diagramática

de los Dominios de un DART® que lleva Fc.

[0023] La **Figura 3** muestra una representación diagramática de los Dominios de un Fc-DART® .

[0024] La **Figura 4** muestra una representación diagramática
5 de los Dominios de un diacuerpo tetravalente, biespecífico
PD-1 x LAG-3 preferido de la presente invención. Cuatro
cadenas de polipéptidos, dos de las cuales tienen los
Dominios de cadenas 1 y 3 de polipéptidos, y dos de las
cuales tienen los Dominios de las cadenas 2 y 4, de
10 polipéptidos se acomplexan en conjunto para formar el
diacuerpo. Los enlaces de disulfuro (mostrados como líneas a
rayas) vinculan covalentemente las cadenas 1 y 2 de
polipéptidos, las cadenas 1 y 3 de polipéptidos y las cadenas
3 y 4 de polipéptidos. Los Dominios de Cadena Ligera Variable
15 y los Dominios de Cadena Pesada Variable de la misma cadena
de polipéptidos se dirigen a diferentes epítomos (ya sea PD-1
o LAG-3), de tal manera que el diacuerpo resultante tiene dos
Dominios de Unión de Epítomo que son inmuno-específicos para
PD-1 y dos dominios de Unión de Epítomo que son
20 inmuno-específicos para LAG-3.

[0025] La **Figura 5** muestra un diagrama del protocolo para
evaluar la capacidad de anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3
para mejorar la proliferación de células T.

[0026] La **Figura 6** muestra que la adición de **mAb 1 de PD-1**
25 (5C4; BMS-936558), **mAb 2 de PD-1** (MK-3475; Merck,

lambrolizumab) y **mAb 3 de PD-1** (EH12.2H7; Dana Farber) en el inicio del ensayo allo-MLR, indujo una fuerte proliferación de células T comparada con el anticuerpo control de isotipo IgG1. También se muestran las respuestas proliferativas
5 obtenidas con **mAb 4 de PD-1** (CT- 011; CureTech, BAT-1), un mAb anti-CTLA y **mAb 1 de LAG-3** (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS). Las células respondedoras (R) son células pan T; células estimuladoras (S) son células dendríticas maduras (mDC).

10 **[0027]** La **Figura 7** muestra los resultados de una evaluación de **mAb 1 de LAG-3** (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS), para potencial proliferativo de células T ya sea solo o en combinación con **mAb 1 de PD-1** (5C4; BMS-936558)), **mAb 2 de PD-1** (MK-3475; Merck, lambrolizumab). Las células
15 respondedoras (R) son células pan T; las células estimuladoras (S) son células dendríticas maduras (mDC).

[0028] La **Figura 8** muestra LAG-3 humano soluble (shLAG-3), el cual se une a las moléculas de clase II HLA humanas expresadas en ambas de las células T APC y CD4, indujeron una
20 respuesta proliferativa fuerte comparado con los pozos control del isotipo IgG o las células respondedoras (R) (células pan T) más las células estimuladoras (S) (células dendríticas maduras (mDC)).

[0029] Las **Figuras 9A-9B** muestran que los diacuerpos
25 biespecíficos PD-1 x LAG-3 de la presente invención indujeron

respuestas proliferativas de células T potentes cuando se comparan contra mAb anti-PD-1 (5C4) o mAb anti-LAG-3 (25F7). La **Figura 9A** muestra las respuestas proliferativas de células T obtenidas utilizando los diacuerpos tetravalentes, 5 biespecíficos PD-1 x LAG-3 preferidos de la presente invención (**PD-1 X LAG-Fc-DART®-1 y PD-1 X LAG-Fc-DART®-2**), **mAb 1 de PD-1** (5C4; BMS-936558)), **mAb 1 de LAG-3** (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS), LAG-3 humano soluble (ShLAG-3), un IgG control, células respondedoras + estimuladoras (células pan T 10 y células dendríticas maduras; R+S) y células estimuladoras (células dendríticas maduras; S). La **Figura 9B** muestra los mismos datos para **PD-1 X LAG-Fc-DART®-1 y PD-1 X LAG-Fc-DART®-2**, **mAb 1 de PD-1** (5C4; BMS- 936558)), **mAb 1 de LAG-3** (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS), y **mAb 1 de PD-1** (5C4; BMS- 15 936558)) + **mAb 1 de LAG-3** (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS), utilizando una escala del eje-y diferente.

Compendio de la Invención:

[0030] La presente invención se dirige a diacuerpos 20 biespecíficos que comprenden dos o más cadenas de polipéptidos y que poseen al menos un Sitio de Unión de Epítipo que es inmuno-específico para un epítipo de PD-1 y al menos un Sitio de Unión de Epítipo que es inmuno-específico para un epítipo de LAG-3 (es decir, un "diacuerpo 25 biespecífico de PD-1 x LAG-3"). Más preferiblemente, la

presente invención se dirige a diacuerpos biespecíficos que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos y los cuales poseen dos Sitios de Unión de Epítopo que son inmuno-específicos para uno (o dos) epítopos de PD-1 y dos Sitios de Unión de Epítopo que son inmuno-específicos para uno (o dos) epítopos de LAG-3 (es decir, un "diacuerpo tetravalente, biespecífico de PD-1 x LAG-3"). La presente invención también se dirige a tales diacuerpos que comprenden adicionalmente un Dominio de Fc de inmunoglobulina ("diacuerpos de Fc biespecíficos" y "diacuerpos de Fc tetravalentes, biespecíficos"). Los diacuerpos de la presente invención son capaces de unirse simultáneamente a PD-1 y a LAG-3; particularmente cuando tales moléculas se disponen sobre las superficies de las células humanas. La invención se dirige a composiciones farmacéuticas que contienen tales diacuerpos, y a métodos que involucran el uso de tales diacuerpos en el tratamiento de cáncer u otras enfermedades y padecimientos.

[0031] En detalle, la invención proporciona un diacuerpo de Fc biespecífico capaz de unirse inmuno-específicamente a un epítopo de PD-1 y a un epítopo de LAG-3, en donde el diacuerpo comprende cuatro cadenas de polipéptidos, cada una teniendo un término amino y un término carboxi, y en donde:

(A) la primera y segunda cadenas de polipéptidos se enlazan covalentemente entre sí, la segunda y tercera cadenas de polipéptidos se enlazan covalentemente entre sí, y

la tercera y cuarta cadenas de polipéptidos se enlazan covalentemente entre sí;

- 5 (B) la primera y tercera cadenas de polipéptidos del diacuerpo cada una comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un Dominio Variable de Cadena Ligera de un anticuerpo que es inmuno-específico para PD-1 o LAG-3, un Dominio Variable de Cadena Pesada de un anticuerpo que es inmuno-específico para LAG-3 o PD-1, un Dominio de Promoción de Heterodímero y un Dominio
- 10 de CH₂-CH₃, en donde los Dominios Variables de Cadena Ligera y los Dominios Variables de Cadena Pesada son incapaces de asociarse para formar un Sitio de Unión de Epítipo capaz de unir un epítipo de PD-1 o un epítipo de LAG-3; y
- 15 (C) la segunda y cuarta cadenas de polipéptidos del diacuerpo cada una comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un Dominio Variable de Cadena Ligera de un anticuerpo que es inmuno-específico para PD-1 o LAG-3, un Dominio Variable de Cadena Pesada de
- 20 un anticuerpo que es inmuno-específico para LAG-3 o PD-1, y un Dominio de Promoción de Heterodímero, en donde los Dominios Variables de Cadena Ligera y los Dominios Variables de Cadena Pesada son incapaces de asociarse para formar un Sitio de Unión de Epítipo capaz de unir
- 25 un epítipo de PD-1 o un epítipo de LAG-3;

y en donde:

- (I) (1) el Dominio Variable de Cadena Ligera de la primera cadena de polipéptidos y el Dominio Variable de Cadena Pesada de la segunda cadena de polipéptidos se asocian para formar un primer Sitio de Unión de Epítopo y el Dominio Variable de Cadena Pesada de la primera cadena de polipéptidos y el Dominio Variable de Cadena Ligera de la segunda cadena de polipéptidos se asocian para formar un segundo Sitio de Unión de Epítopo; y
- (2) el Dominio Variable de Cadena Ligera de la tercera cadena de polipéptidos y el Dominio Variable de Cadena Pesada de la cuarta cadena de polipéptidos se asocian para formar un tercer Sitio de Unión de Epítopo y el Dominio Variable de Cadena Pesada de la tercera cadena de polipéptidos y el Dominio Variable de Cadena Ligera de la cuarta cadena de polipéptidos se asocian para formar un cuarto Sitio de Unión de Epítopo;
- en donde dos de los Sitios de Unión de Epítopo formados son capaces de unirse inmuno-específicamente a un epítopo de PD-1 y dos de los Sitios de Unión de Epítopo formados son capaces de unirse inmuno-específicamente a un epítopo de LAG-3;
- II los Dominios de Promoción de Heterodímero de la primera

y tercera cadenas de polipéptidos difieren y tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de: **SEQ ID NO:16** y **SEQ ID NO: 17**; y

III los Dominios de CH2-CH3 de la primera y tercera cadenas
5 de polipéptidos se asocian para formar un Dominio de Fc.

[0032] La invención también se refiere a la modalidad de un diacuerpo de Fc biespecífico en donde los Dominios de CH2-CH3 de la primera y tercera cadenas de polipéptidos cada una
10 tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:24**.

[0033] La invención también se refiere a la modalidad de los diacuerpos de Fc biespecíficos en donde el Dominio Variable de Cadena Pesada de un anticuerpo que es inmuno-específico para LAG-3 tiene la secuencia de aminoácidos
15 de **SEQ ID NO:11**, y en donde el Dominio Variable de Cadena Ligera de un anticuerpo que es inmuno-específico para LAG-3 tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:12**.

[0034] La invención también se refiere a la modalidad de tales diacuerpos de Fc biespecíficos en donde el Dominio
20 Variable de Cadena Pesada de un anticuerpo que es inmuno-específico para PD-1 tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:2**, y en donde el Dominio Variable de Cadena Ligera de un anticuerpo que es inmuno-específico para PD-1 tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:3**.

25 **[0035]** La invención también se refiere a una composición

farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de cualquiera de los diacuerpos de Fc antes indicados, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0036] La invención también se refiere a la modalidad de
5 tal composición farmacéutica en donde la cantidad efectiva del diacuerpo de Fc biespecífico es una cantidad efectiva para tratar cáncer en un individuo receptor en necesidad de tal tratamiento.

[0037] La invención también se refiere a la modalidad de
10 tales composiciones farmacéuticas en donde el cáncer es un cáncer de glándula adrenal, un Cáncer asociado con SIDA, un sarcoma de parte blanda alveolar, un tumor astrocítico, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, un cáncer de cerebro y de la médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer
15 de mama, un tumores de cuerpo carótido, un cáncer cervical, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma de células renales cromóforo, un carcinoma de células claras, un cáncer de colon, un cáncer colorectal, un histiocitoma fibroso benigno cutáneo, un tumor dermoide de células pequeñas y
20 redondas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, una fibrogénesis imperfecta ossium, una displasia fibrosa del hueso, cáncer de vesícula biliar o conducto biliar, cáncer gástrico, una enfermedad trofoblástica gestacional, un tumor de células germinales, un
25 cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, un tumor

de células de los islotes, un sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, leucemia, un tumor de lipoma/lipomatoso benigno, un tumor de liposarcoma/lipomatoso maligno, un cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer de pulmón, un meduloblastoma, un
5 melanoma, un meningioma, una neoplasia endócrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplásico, un neuroblastoma, tumores neuroendócrinos, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor de paratiroides, un cáncer pediátrico, un tumor de
10 vaina del nervio periférico, un feocromocitoma, un tumor pituitario, cáncer de próstata, un melanoma uveal posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer metastásico renal, un tumor rabdoide, un rabadomiosarcoma, un sarcoma, cáncer de piel, un sarcoma de tejido blando, cáncer de células
15 escamosas, cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico, un timoma, un cáncer metastásico de la tiroides, o un cáncer uterino.

[0038] La invención también se refiere a la modalidad de tales composiciones farmacéuticas en donde la cantidad
20 efectiva del diacuerpo de Fc biespecífico es una cantidad efectiva para tratar una enfermedad asociada con la presencia de un patógeno en un individuo receptor en necesidad de tal tratamiento.

[0039] La invención también se refiere a la modalidad de
25 tal composición farmacéutica en donde el patógeno es una

bacteria, un hongo o un virus.

[0040] La invención también se refiere a un método para tratar cáncer que comprende administrar una cantidad efectiva de tales composiciones farmacéuticas a un individuo en
5 necesidad del mismo.

[0041] La invención también se refiere a un método para tratar una enfermedad asociada con la presencia de un patógeno que comprende administrar una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de cualquiera de las
10 reivindicaciones 8-9 a un individuo en necesidad del mismo.

Descripción Detallada de la Invención:

[0042] La presente invención se dirige a diacuerpos biespecíficos que comprenden dos o más cadenas de
15 polipéptidos y que poseen al menos un Sitio de Unión de Epítopo que es inmuno-específico para un epítopo de PD-1 y al menos un Sitio de Unión de Epítopo que es inmuno-específico para un epítopo de LAG-3 (es decir, un "diacuerpo biespecífico de PD-1 x LAG-3"). Más preferiblemente, la
20 presente invención se dirige a diacuerpos biespecíficos que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos y que poseen dos Sitios de Unión de Epítopo que son inmuno-específicos para un (o dos) epítopos de PD-1 y dos Sitios de Unión de Epítopo que son inmuno-específicos para uno (o dos) epítopos de LAG-3 (es
25 decir, un "diacuerpo tetravalente, biespecífico de PD-1 x

LAG-3"). La presente invención también se dirige a tales diacuerpos que comprenden adicionalmente un Dominio de Fc de inmunoglobulina ("diacuerpos de Fc biespecíficos" y "diacuerpos de Fc tetravalentes, biespecíficos"). Los

5 diacuerpos de la presente invención son capaces de unirse simultáneamente a PD-1 y a LAG-3, particularmente cuando tales moléculas se disponen sobre las superficies de las células humanas. La invención se dirige a composiciones farmacéuticas que contienen tales diacuerpos, y a métodos que

10 implican el uso de tales diacuerpos en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades y padecimientos.

[0043] Los diacuerpos biespecíficos de la presente invención son capaces de unirse simultáneamente a PD-1 y a LAG-3; particularmente cuando tales moléculas se disponen en

15 las superficies de las células humanas. La invención se dirige a composiciones farmacéuticas que contienen tales diacuerpos, y a métodos que implican el uso de tales diacuerpos en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades y padecimientos. En particular, los diacuerpos biespecíficos de

20 PD-1 x LAG-3 de la presente invención comprenden cadenas de polipéptidos que se acomplejan covalentemente en conjunto.

[0044] Como se discute en lo anterior, la activación de células T requiere dos señales distintas. La primera señal se proporciona por el Receptor de Células T (TCR) expresado

25 sobre la superficie de una célula T que ha reconocido un

antígeno de péptido dentro del contexto de los antígenos de leucocito humano (HLA) expresados en una Célula de Presentación de Antígeno (APC). La segunda señal se proporciona por la interacción de pares de cognado de los
5 ligandos co-estimuladores: B7-1 y B7-2 expresados en APC y sus receptores correspondientes: CD28 y CTLA-4 expresados en las células T.

[0045] Dentro de los ejes de ligando receptor, el acoplamiento de moléculas co-estimuladoras B7 con el receptor
10 CD28 puede estimular la proliferación de las células T y subsecuentemente induce la expresión de CTLA-4, un regulador negativo y el contra-receptor para CD28 que compite fuertemente por los ligandos B7-1 y B7-2 para "reducir" la activación de células T y las respuestas proliferativas. Los
15 anticuerpos agonistas que unen CD28 se ha mostrado que inducen la función efectora de células T y mejoran la generación de inmunidad por la erradicación del tumor y son co-estimuladores en la naturaleza. Por el contrario, los antagonistas que bloquean el acoplamiento de CTLA-4 pueden
20 prevenir que las células T desacoplen su función efectora mientras que mantienen una proliferación sostenida que puede conducir a autoinmunidad.

[0046] En paralelo con el eje CTLA-4:B7-1/B7-2, cuyas funciones activan el sistema inmune durante la homeostasis
25 normal y en la fase de cebado de una respuesta inmune contra

un antígeno, un segundo eje de ligando receptor funciona para inhibir el sistema inmune, sirviendo por consiguiente como un contra-punto para CTLA-4 durante la fase efectora de una respuesta inmune. Este segundo eje implica la unión del

5 receptor de proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), expresada sobre la superficie de células T, a sus ligandos correspondientes: PD-11 y PD-12, expresados en las Células de Presentación de Antígeno (APC) y células epiteliales, respectivamente (Chen L. *et al.* (2013) "*Molecular Mechanisms*

10 *Of T-Cell Co-Stimulation And Co-Inhibition*", *Nature Reviews Immunology* 13(4):227-242). En contraste con los anticuerpos agonistas que se unen a CD28 para estimular las respuestas de células T, los anticuerpos que se unen a cualquier PD-1 o PD-11 antagoniza o bloquea el acoplamiento de PD-1/PD-11 son

15 capaces de mantener las respuestas de células T al prevenir el suministro de una señal negativa hacia las células T. Esto aumenta o mantiene la proliferación de células, la citotoxicidad y la secreción de citocina. Tomados en conjunto, los anticuerpos agonistas, tal como anti-CD28,

20 dirige las trayectorias de señal positivas y por lo tanto son co-estimuladores, mientras que los anticuerpos antagonistas, tales como anti-PD-1, dirigen la trayectoria de señal negativa y se denominan inhibidores de punto de control.

[0047] Aunque, CTLA-4 y PD-1 representan los inhibidores

25 de punto de control canónicos, existe una familia creciente

de pares de ligandos de receptor de inmunomodulación. El gen de activación por linfocitos 3 (LAG-3), discutido en lo anterior, es un objetivo inhibidor de punto de control adicional expresado en células T que se une a las moléculas HLA clase II expresadas en APC. LAG-3 es co-expresado con PD-1 en linfocitos de infiltración de tumor exhaustos y tolerantes ("TIL") (Matsuzaki, J. et al. (2010) "*Tumor-Infiltrating NY-ESO-1-Specific CD8+ T-Cells Are Negatively Regulated by LAG-3 and PD-1 in Human Ovarian Cancer*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 107(17):7875- 7880; Okazaki, T. et al. (2011) "*PD-1 and LAG-3 inhibitor Coreceptors Act Synergistically To Prevent Autoimmunity In Mice*", J. Exp. Med. 208(2):395-407), y la expresión LAG-3 se ha reportado en las células reguladoras T que implican un papel en la inmunología y autoinmunidad tumoral. Los modelos animales han demostrado que anti-LAG-3 induce suficiente inmunidad de erradicación de tumor potente para desacelerar el crecimiento tumoral, y cuando se da en combinación con mAb anti-PD-1 puede incluso desencadenar la regresión tumoral completa (Woo, S.R. et al. (2012) "*Immune Inhibitory Molecules LAG-3 And PD-1 Synergistically Regulate T-Cell Function To Promote Tumoral Immune Escape*", Cancer Res. 72(4):917-927). Las terapias de combinación que implican BMS-986016 de mAb anti-LAG-3 se encuentran actualmente bajo investigación clínica de fase temprana ya sea solas o en combinación con mAb anti-PD-1

(nivolumab/BMS-936558) (véase, Creelan, B.C. (2014) "*Update on Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer*" Cancer Control 21 (1):80- 89).

[0048] Los diacuerpos biespecíficos de la presente
 5 invención son capaces de unirse a moléculas de superficie de
 células PD-1 y LAG-3 que se encuentran presentes sobre las
 superficies de linfocitos de infiltración de tumor exhaustos
 y tolerantes, y de afectar por consiguiente la capacidad de
 tales moléculas de superficie de células para unirse a sus
 10 ligandos receptores. Como tales, los diacuerpos biespecíficos
 de PD-1 x LAG-3 de la presente invención son capaces de
 atenuar la inhibición del sistema inmune mediado por PD-1 y
 LAG-3, y promover la activación del sistema inmune continuo.

15 **I. Técnicas Generales y Definiciones Generales**

[0049] La práctica de la presente invención empleará, a
 menos que se indique de otra forma, técnicas convencionales
 de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes),
 microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología,
 20 los cuales se encuentran dentro de la experiencia del arte.
 Tales técnicas se explican completamente en la literatura tal
 como, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Third Edition
 (Sambrook et al. Eds., 2001) Cold Spring Harbor Press, Cold
 Spring Harbor, NY; OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: METHODS AND APPLICATIONS
 25 (Methods in Molecular Biology), Herdewijn, P., Ed., Humana

Press, Totowa, NJ; OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (Gait, M.J., Ed.,
 1984); METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Humana Press, Totowa, NJ; CELL
 BIOLOGY: A LABORATORY NOTEBOOK (Cellis, J.E., Ed., 1998) Academic
 Press, New York, NY; ANIMAL CELL CULTURE (Freshney, R.I., Ed.,
 5 1987); INTRODUCTION TO CELL AND TISSUE CULTURE (Mather, J.P. and
 Roberts, P.E., Eds., 1998) Plenum Press, New York, NY; CELL
 AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES (Doyle, A. *et al.*, Eds.,
 1993-8) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; METHODS IN ENZYMOLOGY
 (Academic Press, Inc.) New York, NY; WEIR'S HANDBOOK OF
 10 EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY (Herzenberg, L.A. *et al.* Eds. 1997)
 Wiley-Blackwell Publishers, New York, NY; GENE TRANSFER VECTORS
 FOR MAMMALIAN CELLS (Miller, J.M. *et al.* Eds., 1987) Cold Spring
 Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; CURRENT PROTOCOLS IN
 MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel, F.M. *et al.*, Eds., 1987) Greene Pub.
 15 Associates, New York, NY; PCR: THE POLYMERASE CHAIN REACTION,
 (Mullis, K. *et al.*, Eds., 1994) Birkhäuser, Boston MA; CURRENT
 PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (Coligan, J.E. *et al.*, eds., 1991) John
 Wiley and Sons, Hoboken, NJ; SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY
 (John Wiley and Sons, 1999) Hoboken, NJ; IMMUNOBIOLOGY 7
 20 (Janeway, C.A. *et al.* 2007) Garland Science, London, UK;
 Antibodies (P. Finch, 1997) Stride Publications, Devoran, UK;
 ANTIBODIES: A PRACTICAL APPROACH (D. Catty., ed., 1989) Oxford
 University Press, USA, New York NY); . MONOCLONAL ANTIBODIES: A
 PRACTICAL APPROACH (Shepherd, P. *et al.* Eds., 2000) Oxford
 25 University Press, USA, New York NY; USING ANTIBODIES: A LABORATORY

MANUAL (Harlow, E. et al. Eds., 1998) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; THE ANTICUERPOS (Zanetti, M. et al. Eds. 1995) Harwood Academic Publishers, London, UK); and DEVITA, HELLMAN, AND ROSENBERG'S CANCER: PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY, EIGHTH Edition, DeVita, V. et al. Eds. 2008, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

[0050] Como se utiliza en la presente, "**anticuerpos**" son moléculas de inmunoglobulina capaces de unirse específicamente a un objetivo, tal como carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se utiliza en la presente, el término abarca no sólo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también mutantes del mismo, variantes de origen natural, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo con un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, y anticuerpos quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida. Los anticuerpos de origen natural típicamente comprenden dos copias de una cadena de polipéptidos "pesada" ("H") y dos copias de una cadena de polipéptidos "ligera" ("L"). Cada cadena ligera se encuentra comprendida de una Región Variable de Cadena Ligera

(“VL”) y una región constante de cadena ligera (“CL”), cada cadena pesada se encuentra comprendida de una Región Variable de Cadena Pesada (“VH”) y una región constante de cadena pesada, usualmente comprendida de los tres dominios (CH1, CH2 y CH3). Los Dominios CH2 y CH3 de los polipéptidos de cadena pesada interactúan entre sí para formar una región de Fc que sea capaz de unirse a los receptores de Fc presentes en las superficies de las células del sistema inmune.

[0051] La capacidad de un anticuerpo intacto, no modificado (*por ejemplo*, un IgG) para unirse a un epítipo de un antígeno depende de la presencia de los Dominios variables en las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina (*es decir*, los Dominios de VL y VH, respectivamente). La interacción de una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo y en particular, la interacción de sus Dominios de VL y VH forman uno de los sitios de unión de epítipo del anticuerpo. En contraste, un fragmento de “**scFv**” de un anticuerpo comprende un Dominio de VL y VH de un anticuerpo contenido en una cadena de polipéptidos simple en donde los Dominios se separan por un enlazador flexible de longitud suficiente para permitir el auto-ensamble de los dos Dominios en un Sitio de Unión de Epítipo funcional.

[0052] Cuando el auto-ensamble de los Dominios de VL y VH se hace imposible debido a un enlazador de longitud insuficiente (menos de aproximadamente 12 residuos de

aminoácidos), dos de los constructos de scFv interactúan entre sí para formar un **"diacuerpo"**, el cual es una molécula bivalente en la cual el VL de una cadena asociada con el VH del otro (revisado en Marvin et al. (2005) *"Recombinant*
 5 *Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies"*, Acta Pharmacol. Sin. 26:649- 658).

[0053] Además de sus usos conocidos en diagnósticos, los anticuerpos se ha demostrado que son útiles como agentes terapéuticos. Las últimas décadas han visto un renacimiento
 10 de interés en el potencial terapéutico de anticuerpos, y los anticuerpos se han vuelto una de las clases principales de fármacos derivados de biotecnología (Chan, C.E. et al. (2009) *"The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases"*, Singapore Med. J. 50(7):663-666). 200 fármacos a
 15 base de anticuerpos se han aprobado para su uso o se encuentran bajo desarrollo.

[0054] El término **"anticuerpo monoclonal"** se refiere a una población de anticuerpos homogéneos en donde el anticuerpo monoclonal está comprendido de aminoácidos (de origen natural
 20 y de origen no natural) que se implican en la unión selectiva de un antígeno. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, se dirigen contra un sitio antigénico simple. El término anticuerpo monoclonal abarca no solamente anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud
 25 completa, sino también fragmentos de los mismos (tales como

Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), cadena simple (scFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, y cualquier otra configuración
5 modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida y la capacidad para unir a un antígeno. No se pretende limitarse en lo que respecta a la fuente del anticuerpo o la manera en la cual se hace (*por ejemplo*, por
10 hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). El término incluye inmunoglobulinas completas así como también los fragmentos, etc., descritos en lo anterior bajo la definición de "anticuerpo". Los métodos para elaborar anticuerpos
15 monoclonales se conocen en la técnica. Un método que puede emplearse es el método de Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity", Nature 256:495-497 o una modificación del mismo.

20 **[0055]** Típicamente, los anticuerpos monoclonales se desarrollaron en ratones, ratas o conejos. Los anticuerpos se produjeron para inmunizar un animal con una cantidad inmunogénica de células, extractos de células o preparaciones de proteínas que contienen el epítipo deseado. El inmunógeno
25 puede ser, pero no se limita a, células primarias, líneas

celulares cultivadas, células cancerosas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, o tejido. Las células utilizadas para inmunización pueden cultivarse durante un periodo de tiempo (*por ejemplo*, al menos 24 horas) antes de su uso como un inmunógeno. Las células pueden utilizarse como inmunógenos por sí mismas o en combinación con un adyuvante no desnaturalizante, tal como Ribí. En general, las células deben mantenerse intactas y de preferencia viables cuando se utilizan como inmunógenos. Las células intactas pueden permitir a los antígenos detectarse mejor que las células rotas por el animal inmunizado. El uso de adyuvantes desnaturalizantes o severos, *por ejemplo*, adyuvante de Freud, puede romper células y por lo tanto no se recomienda. El inmunógeno puede administrarse en múltiples momentos en intervalos periódicos tales como, quincenal o semanalmente o pueden administrarse de tal manera que mantienen la viabilidad en el animal (*por ejemplo*, en un tejido recombinante). Alternativamente, los anticuerpos monoclonales existentes y cualesquier otros anticuerpos equivalentes que son inmuno-específicos para un epítipo patogénico deseado pueden estar en secuencia y producirse recombinantemente por medios conocidos en la técnica. En una modalidad, tal anticuerpo se pone en secuencia y la secuencia de polinucleótido entonces se clona en un vector para expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de

interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped entonces puede expandirse y congelarse para su uso futuro. La secuencia de polinucleótido de tales anticuerpos puede utilizarse para manipulación genética para
5 generar las moléculas biespecíficas de la invención así como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo caninizado, para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. El principio general para humanizar un anticuerpo implica retener la secuencia básica
10 de la porción de unión de epítipo del anticuerpo, que reemplaza el resto no humano del anticuerpo con secuencias de anticuerpo humano. Existen cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Éstas son: (1) determinar la secuencia de aminoácidos de nucleótido y prevista del
15 anticuerpo de partida de los Dominios variables ligero y pesado (2) diseñar el anticuerpo humanizado anticuerpo caninizado, *es decir*, que decide cuál región de infraestructura de anticuerpo utilizar durante el proceso de humanización o proceso de caninización (3) las
20 metodologías/técnicas de humanización o caninización actuales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Patentes de E.U. Nos. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; y 6,331,415.

[0056] Los anticuerpos naturales son capaces de unirse a
25 sólo una de las especies de epítipo (*es decir*, son mono-

específicas), aunque pueden unirse a copias múltiples de esa especie (*es decir*, exhibir bivalencia o multivalencia). Una amplia variedad de formatos de anticuerpo biespecíficos recombinantes se ha desarrollado (véase, *por ejemplo*,
5 Publicaciones de PCT Nos. WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968), la mayoría de las cuales utiliza enlazador de péptidos ya sea para fusionar el núcleo de anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) a una proteína de unión adicional (por ejemplo, scFv) o para fusionar por
10 ejemplo dos fragmentos Fab o scFv. Típicamente, tales procedimientos implican compromisos e intercambios. Por ejemplo, las Publicaciones de PCT Nos. WO 2013/174873, WO 2011/133886 y WO 2010/136172 describen que el uso de enlazadores puede provocar problemas en ajustes terapéuticos
15 y enseña un anticuerpo triespecífico en el cual los Dominios CL y CH1 se transmutan de sus posiciones naturales respectivas y los Dominios VL y VH se han diversificado (WO 2008/027236; WO 2010/108127) para permitirles unir a más de un antígeno. De este modo, las moléculas descritas en estos
20 documentos marcan la especificidad de unión para la capacidad de unir las especies de antígeno adicionales. Las Publicaciones de PCT Nos. WO 2013/163427 y WO 2013/119903 describen la modificación del Dominio de CH2 para contener un aducto de proteína de fusión que comprende un dominio de
25 unión. El documento nota que el Dominio de CH2 probablemente

juega solamente un papel mínimo en mediar la función efectora. Las Publicaciones de PCT Nos. WO 2010/028797, WO2010028796 y WO 2010/028795 describen anticuerpos recombinantes cuyas Regiones de Fc se han remplazado con los

5 Dominios de VL y VH adicionales, de manera que forman moléculas de unión trivalentes. Las Publicaciones de PCT Nos. WO 2003/025018 y WO2003012069 describen diacuerpos recombinantes cuyas cadenas individuales contienen dominios de scFv. La Publicación de PCT No. WO 2013/006544 describe

10 moléculas de Fab multivalentes que se sintetizan como una cadena de polipéptidos simple y después se someten a proteólisis para producir las estructuras heterodiméricas. De este modo, las moléculas descritas en estos documentos marcan todo o parte de la capacidad de mediar la función efectora

15 por la capacidad de unir las especies de antígeno adicionales. Las Publicaciones de PCT Nos. WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 y WO 1991/003493 describen agregar los Dominios de Unión

20 adicionales o grupos funcionales a un anticuerpo o una porción de anticuerpo (*por ejemplo*, agregar un diacuerpo a la cadena ligera del anticuerpo, o agregar los Dominios de VL y VH a las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, o agregar una proteína de fusión heteróloga o encadenar los Dominios de

25 Fab múltiples entre sí). De esta manera, las moléculas

descritas en estos documentos tratan la estructura de anticuerpo nativo para la capacidad de unir especies de antígeno adicionales.

[0057] La técnica ha notado adicionalmente la capacidad de
 5 producir **diacuerpos** que difieren de anticuerpos naturales y que es capaz de unir dos o más especies de epítipo diferentes (es decir, exhibir biespecificidad o multiespecificidad además de bivalencia o multivalencia) (véase, por ejemplo, Holliger et al. (1993) "*Diabodies': Small Bivalent And*
 10 *Bispecific Antibody Fragments*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The
 15 *Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*", J. Biol. Chem. 280(20): 19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling
 20 *For Tumor Targeting Applications*", Protein Eng Des Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", Protein Engineering 14(2): 1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody
 25 *For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By*

Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", Cancer Res. 69(12):4941-4944).

[0058] El diseño de un diacuerpo se basa en los fragmentos de región variable de cadena simple (scFv). Tales moléculas se elaboran al unir las regiones variables de cadena ligera y/o pesada al utilizar un péptido de enlace corto. Bird et al. (1988) ("*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*", Science 242:423-426) describe un ejemplo de péptidos de enlace los cuales son de aproximadamente 3.5 nm entre el término carboxi de una región variable y el término amino de la otra región variable. Los enlazadores de otras secuencias se han designado y utilizado (Bird et al. (1988) "*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*", Science 242:423-426). Los enlazadores pueden a su vez modificarse para funciones adicionales, tales como unión de fármacos para soportes sólidos. Las variantes de cadena simple pueden producirse ya seas recombinante o sintéticamente. Para la producción sintética de scFv, puede utilizarse un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, un polinucleótido que contiene un plásmido adecuado que codifica scFv puede introducirse en una célula huésped adecuada, ya

sea eucariótica, tal como células de levadura, de planta células de insecto o mamífero o procarióticas, tal como E. coli. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden elaborarse por manipulaciones de rutina tales como
5 ligación de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse utilizando técnicas de purificación de proteína estándar conocidas en el arte.

[0059] La Patente de los Estados Unidos No. 7,585,952 y la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2010-0173978
10 se refiere a moléculas de scFv que son inmuno-específicas para ErbB2. Se han descrito un acoplador de células T biespecíficas ("**BiTEs**"), un tipo de molécula de scFv (WO 05/061547; Baeuerle, P et al. (2008) "*BiTE: A New Class Of Antibodies That Recruit T-Cells*", *Drugs of the Future* 33:
15 137-147; Bargou, et al. 2008) "*Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T-Cell-Engaging Antibody*", *Science* 321: 974-977). Tales moléculas están compuestas de una molécula de cadena de polipéptidos simple que tiene dos dominios de unión de antígeno, uno de los cuales se une
20 inmuno-específicamente a un epítipo de CD3 y el segundo de los cuales se une inmuno-específicamente a un antígeno presente sobre la superficie de una célula objetivo.

[0060] La provisión de diacuerpos no monoespecíficos proporciona una ventaja significativa: la capacidad de co-
25 ligar y co-ubicar epítopos diferentes. Los diacuerpos

bivalentes de esta manera tienen un amplio margen de aplicaciones que incluyen terapia e inmunodiagnóstico. La bivalencia permite mayor flexibilidad en el diseño e ingeniería del diacuerpo en diversas aplicaciones, que
 5 proporcionan una avidéz mejorada de antígenos multiméricos, la reticulación de diferentes antígenos, y la acción dirigida al tipo de células específicas depende de la presencia de los antígenos objetivo. Debido a su valencia incrementada, los bajos índices de disociación y aclaración rápida de la
 10 circulación (para diacuerpos de tamaño pequeño, o por debajo de ~50 kDa), las moléculas de diacuerpo conocidas en la técnica también han mostrado su uso particular en el campo de formación de imágenes de tumor (Fitzgerald et al. (1997) "*Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies*
 15 *Expressed In Pichia pastoris*," Protein Eng. 10:1221).

[0061] La bivalencia de diacuerpos ha llevado su uso a co-
 ligar diferentes células, por ejemplo, células T citotóxicas de reticulación a células de tumor (Staerz et al. (1985) "*Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T-Cells*,"
 20 Nature 314:628-631, and Holliger et al. (1996) "*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*," Protein Eng. 9:299-305). De esta manera, por ejemplo, los Dominios de Unión de Epítipo de diacuerpo pueden dirigirse a una superficie determinante de cualquier
 25 célula efectora inmune tal como CD3, CD16, CD32, o CD64, las

cuales se expresan en linfocitos T, células Exterminadoras Naturales (NK) u otras células mononucleares. En muchos estudios, la unión de diacuerpo de los determinantes de células efectoras, *por ejemplo*, receptores de Fc γ (Fc γ R),
5 también se encontró que activan la célula efectora (Holliger *et al.* (1996) "*Specific Killing Of Linfoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*", Protein Eng. 9:299-305; Holliger *et al.* (1999) "*Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced*
10 *By Anti-CD3 X Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 X Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins*," Cancer Res. 59:2909-2916; WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). Normalmente, la activación de la célula efectora se desencadena por la unión de un anticuerpo de
15 unión de antígeno a una célula efectora mediante interacción de Fc-Fc γ R; de esta manera, en este respecto, las moléculas de diacuerpo pueden mostrar la funcionalidad similar a Ig independientemente de si comprenden un Dominio de Fc (*por ejemplo*, se ensayó en cualquier ensayo de función efectora
20 conocido en la técnica o ejemplificado en la presente (*por ejemplo*, ensayo de ADCC)). Al reticular las células tumorales y efectoras, el diacuerpo no sólo lleva la célula efectora dentro de la proximidad de las células tumorales sino que conduce al exterminio del tumor efectivo (*véase por ejemplo*,
25 Cao *et al.* (2003) "*Bispecific Antibody Conjugates In*

Therapeutics", Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197).

[0062] Sin embargo, las ventajas anteriores tienen un costo relevante. La formación de tales diacuerpos monoespecíficos requiere del ensamble exitoso de dos o más polipéptidos distintos y diferentes (*es decir*, tal formación requiere que los diacuerpos se formen a través de la heterodimerización de diferentes especies de cadena de polipéptidos). Este hecho se encuentra en contraste con los diacuerpos monoespecíficos, los cuales se forman a través de la homodimerización de cadenas de polipéptidos idénticas. Debido a que al menos dos polipéptidos disimilares (*es decir*, dos especies de polipéptidos) deben proporcionarse para formar un diacuerpo no monoespecífico y debido a que la homodimerización de tales polipéptidos conduce a moléculas inactivas (Takemura, S. et al. (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*", Protein Eng. 13(8):583-588), la producción de tales polipéptidos debe llevarse a cabo de una manera tal para evitar la unión covalente entre los polipéptidos de las mismas especies (Takemura, S. et al. (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*", Protein Eng. 13(8):583-588).

[0063] La técnica por lo tanto ha enseñado la asociación no covalente de tales polipéptidos (véase, por ejemplo, Olafsen et al. (2004) "*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA*

Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20): 19665-19672). Sin embargo, la técnica ha reconocido que los diacuerpos biespecíficos compuestos de polipéptidos no covalentemente asociados son inestables y fácilmente se disocian en monómeros no funcionales (véase, por ejemplo, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20): 19665-19672).

[0064] Para enfrentar este reto, la técnica ha conseguido desarrollar diacuerpos no monoespecíficos heterodiméricos covalentemente enlazados estables, denominados **DART®** (véase, por ejemplo, Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nos. 2013-0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; Publicación

de Patente Europea No. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones de PCT Nos. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; y Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To

5 Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Linfoma", Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor 1Tb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold", Arthritis Rheum. 62(7): 1933-

10 1943; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion", J. Mol. Biol. 399(3):436-449). Tales diacuerpos comprenden dos o más polipéptidos covalentemente acomplexados e implica

15 diseñar por ingeniería uno o más residuos de cisteína en cada una de las especies de polipéptido empleadas. Por ejemplo, la adición de un residuo de cisteína al c-término de tales constructos se ha mostrado que permite enlazar disulfuro entre las cadenas de polipéptidos, estabilizando los

20 heterodímeros resultantes sin interferir con las características de unión de las moléculas bivalentes.

[0065] Cada uno de los dos polipéptidos de DART® más simple comprende tres Dominios (Figura 1). El primer polipéptido comprende: (i) un Dominio que comprende una

25 región de unión de un Dominio Variable de Cadena Ligera de la

primera inmunoglobulina (VL1), (ii) un segundo Dominio que comprende una región de unión de un Dominio Variable de Cadena Pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2), y (iii) un tercer Dominio que sirve para promover la heterodimerización con el segundo polipéptido y para enlazar covalentemente el primer polipéptido al segundo polipéptido del diacuerpo. El segundo polipéptido contiene un primer Dominio complementario (un Dominio VL2), un segundo Dominio complementario (un Dominio VH1) y un tercer Dominio que se acompleja con el tercer Dominio de la primera cadena de polipéptidos para promover la heterodimerización y unirse covalentemente con la primera cadena de polipéptidos. Tales moléculas son estables, potentes y tienen la capacidad de unir simultáneamente dos o más antígenos.

15 **[0066]** En una modalidad, los terceros Dominios del primer y segundo polipéptidos, cada uno contiene un residuo de cisteína, el cual sirve para unir los polipéptidos en conjunto mediante un enlace de disulfuro. El tercer Dominio de uno o ambos de los polipéptidos puede poseer adicionalmente la secuencia de un Dominio de CH2-CH3, de tal manera que la forma acomplejada de los polipéptidos de diacuerpo forma un Dominio de Fc que es capaz de unirse al receptor de Fc de células (tal como linfocitos B, células dendríticas, células de Exterminio Natural, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y células de mastocitos)

20
25

(**Figura 2**). Muchas variaciones de tales moléculas se han descrito (véase, *por ejemplo*, Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2013-0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; Publicación de Patente Europea No. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones de PCT No. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Estos DART® que llevan Fc pueden comprender tres cadenas de polipéptidos. El primer polipéptido de tal diacuerpo contiene tres Dominios: (i) un Dominio que contiene VL1, (ii) un Dominio que contiene VH2 y (iii) un Dominio que contiene una secuencia de CH2-CH3. El segundo polipéptido de tal DART® contiene: (i) un Dominio que contiene VL2, (ii) un Dominio que contiene VH1 y (iii) un Dominio que promueve la heterodimerización y la unión covalente con la primera cadena de polipéptidos del diacuerpo. El tercer polipéptido de tal DART® comprende una secuencia de CH2-CH3. De esta manera, la primera y segunda cadenas de polipéptidos de tal DART® se acomplejan en conjunto para formar un sitio de unión de VL1/VH1 que es capaz de unirse al epítipo, así como también un sitio de unión de VL2/VH2 que es capaz de unirse al segundo epítipo. El primer y segundo polipéptidos se unen entre sí a través de una unión de disulfuro que implica residuos de cisteína en sus terceros Dominios respectivos. Notablemente, la primera y tercera cadenas de polipéptidos se acomplejan entre sí para formar un Dominio de Fc que se estabiliza mediante una unión

de disulfuro. Tales diacuerpos tienen una potencia mejorada. Tales **DART®** que llevan Fc pueden tener cualquiera de dos orientaciones (**Tabla 1**):

Tabla 1		
Primera Orientación	3ª Cadena	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -VL1 -VH2-Dominio de Promoción de Heterodímero-CH ₂ -CH ₃ -COOH
	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1 -Dominio de Promoción de Heterodímero-COOH
Segunda Orientación	3ª Cadena	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-Dominio de Promoción de Heterodímero-COOH
	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1 -Dominio de Promoción de Heterodímero-COOH

[0067] También se ha descrito un DART® aún más complejo, denominado como **Fc-DART® (Figura 3)** (WO 2012/018687). Los **Fc-DART®** tienen cuatro cadenas de polipéptidos. La primera y tercera cadenas de polipéptidos de tal diacuerpo contienen tres Dominios: (i) un Dominio que contiene VL1, (ii) un Dominio que contiene VH2 y (iii) un Dominio que contiene una secuencia de CH₂-CH₃. El segundo y cuarto polipéptido Fc-DART® contiene: (i) un Dominio que contiene VL2, (ii) un Dominio que contiene VH1 y (iii) un Dominio que promueve la heterodimerización y la unión covalente con la primera cadena de polipéptidos de los Fc-DART™. Los Dominios de VL y/o VH de la tercera y cuarta cadenas de polipéptidos, y los Dominios de VL y/o VH de la primera y segunda cadenas de polipéptidos pueden ser los mismos o diferentes para permitir la unión

tetravalente que es ya sea monoespecífica, biespecífica o tetraespecífica (**Tabla 2**).

Tabla 2		
Biespecífica	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -VL1 -VH2-[CH ₂ -CH ₃]-COOH
	3ª Cadena	NH ₂ -VL1 -VH2-[CH ₂ -CH ₃]-COOH
	4ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-COOH
Tetraespecífica	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -VL1 -VH2-[CH ₂ -CH ₃]-COOH
	3ª Cadena	NH ₂ -VL3-VH4-[CH ₂ -CH ₃]-COOH
	4ª Cadena	NH ₂ -VL4-VH3-COOH

[0068] A través de esta aplicación, la numeración de los residuos de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de anticuerpos de acuerdo con el índice de EU como en Kabat et al. (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication No. 91-3242.

[0069] Los términos “**polipéptido**” y “**péptido**” se utilizan intercambiablemente en la presente para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud, pero especialmente longitudes mayores de 3, 5, 10, 15, 20 ó 25 residuos de aminoácidos. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede interrumpirse por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de unión de disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o

cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente etiquetado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, 5 por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como también otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos de esta invención pueden presentarse como cadenas simples o como cadenas complejas.

[0070] Los términos "**diacuerpo**" y "**DART™**" se han discutido 10 en lo anterior. Un DART® es un tipo de diacuerpo que comprende al menos dos cadenas de polipéptidos que se acompletean de preferencia entre sí a través de una interacción covalente para formar al menos dos sitios de unión de epítipo, los cuales pueden reconocer el mismo o 15 diferentes epítipos. Dos de las cadenas de polipéptidos de un diacuerpo o DART™ cada una comprende una Región Variable de Cadena Ligera de inmunoglobulina y una Región Variable de Cadena Pesada de inmunoglobulina, aunque estas regiones no interactúan para formar un Sitio de Unión de Epítipo (*es* 20 *decir*, son mutuamente "**complementarias**"). Más bien, la Región Variable de Cadena Pesada de inmunoglobulina de uno (*por ejemplo*, el primero) del diacuerpo o las cadenas de polipéptidos DART™ interactúa con la Región Variable de Cadena Ligera de inmunoglobulina de un diferente (*por* 25 *ejemplo*, el segundo) diacuerpo o cadena de polipéptidos de

DART™ para formar un Sitio de Unión de Epítopo. De forma similar, la Región Variable de Cadena Ligera de inmunoglobulina de uno (*por ejemplo*, el primero) del diacuerpo o las cadenas de polipéptidos de DART™ interactúa

5 con la Región Variable de Cadena Pesada de inmunoglobulina de un diferente (*por ejemplo*, el segundo) diacuerpo o cadena de polipéptidos de DART™ para formar un Sitio de Unión de Epítopo. Las moléculas de DART™ se describen en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nos. 2013-

10 0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; Publicación de Patente Europea No. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones de PCT Nos. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; WO 2006/113665, WO 2008/157379 y Moore, P.A. et al. (2011) *"Application Of Dual Affinity Retargeting*

15 *Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Linfoma"*, Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) *"Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold"*,

20 Arthritis Rheum. 62(7): 1933-1943; y Johnson, S. et al. (2010) *"Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion"*, J. Mol. Biol. 399(3):436-449.

[0071] Como se utiliza en la presente, los términos

25 **"asociación"** o **"asociar"**, con respecto a polipéptidos (*por*

ejemplo, un polipéptido de diacuerpo a otro, una cadena ligera de inmunoglobulina a una cadena pesada de inmunoglobulina, un Dominio de CH2-CH3 a otro Dominio de CH2-CH3, etc.) se pretende que indiquen una combinación no
5 *covalente de los polipéptidos. Los términos "complejos" o "complejidad" se pretenden para indicar una combinación covalente de los polipéptidos.*

[0072] Como se utiliza en la presente, los diacuerpos de la presente invención son los que median la "**unión**
10 **coordinada**" si sus Dominios de Unión de Epítipo son capaces de unirse concurrentemente a sus epítopos reconocidos respectivos. Tal unión puede ser simultánea.

[0073] Los Dominios de Unión de Epítipo de los diacuerpos de la presente invención se unen a sus epítopos reconocidos
15 en una manera "**inmunoespecífica**". Como se utiliza en la presente, un anticuerpo, diacuerpo u otra molécula de unión de epítipo es decir para unir "**inmunoespecíficamente**" una región de otra molécula (*es decir, un epítipo*) si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor
20 duración y/o con mayor afinidad que con el epítipo en relación con epítopos alternativos. Por ejemplo, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo viral es un anticuerpo que une este epítipo viral con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que
25 lo que se une inmunoespecíficamente a otros epítopos virales

o epítomos no virales. También se entiende en esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o porción o epítomo) que se une inmuno-específicamente al primer objetivo puede o puede no unirse específica o preferencialmente a un segundo objetivo.

5 Como tal, la "unión específica" no necesariamente requiere (aunque puede incluir) unión exclusiva. En general, pero no necesariamente, referencia a unión significa unión "específica".

[0074] Los diversos Dominios de inmunoglobulina de tales
10 moléculas pueden derivarse de inmunoglobulinas de cualquier isotipo o alotipo que incluyen, pero no se limitan a, IgA, IgD, IgG, IgE y IgM. En modalidades preferidas, como se discute en lo siguiente tales inmunoglobulinas se derivan de inmunoglobulinas de IgG. En modalidades específicas, el
15 isotipo de IgG utilizado es IgG1, sin embargo, IgG de otros isotipos (por ejemplo, IgG2, IgG3 o IgG4 o un alotipo de los mismos) pueden emplearse.

20 **II. Diacuerpos Biespecíficos de PD-1 x LAG-3 Preferidos de la Presente Invención**

[0075] La presente invención se refiere a diacuerpos biespecíficos de PD-1 x LAG-3. Los diacuerpos biespecíficos de PD-1 x LAG-3 preferidos de la presente invención poseen fragmentos de unión de epítomo de anticuerpos que les
25 permiten ser capaces de unirse coordinadamente a dos

diferentes epítomos: un epítomo de PD-1 y un epítomo de LAG-3, para atenuar las actividades inhibitoras de tales moléculas. Como se utiliza en la presente, tal atenuación se refiere a una disminución de al menos 20%, una disminución de al menos 50%, una disminución de al menos 80%, o una disminución de al menos 90% en la actividad inhibitora de PD-1 y o LAG-3 detectable, o la eliminación completa de la actividad inhibitora de PD-1 y o LAG-3 detectable.

10 **A. Capacidades de Unión Anti-PD-1**

[0076] Anticuerpos que son inmuno-específicos for PD-1 se conocen (véase, *por ejemplo*, Patentes de los Estados Unidos No. 8,008,449; 8,552,154; Publicaciones de Patente de PCT WO 2012/135408; WO 2012/145549; y WO 2013/014668). Los anticuerpos deseados adicionales pueden elaborarse al aislar hibridomas de secreción de anticuerpos producidos utilizando PD-1 o un fragmento de péptido de los mismos. PD-1 humano (incluyendo una secuencia de señal de residuos de 20 aminoácidos (mostrados subrayados) y la proteína madura de residuos de 268 aminoácidos) tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:1**):

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE
25 VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI

GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT
 IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL

[0077] Los anticuerpos anti-PD-1 preferidos incluyen: **mAb 1 de PD-1** (5C4; BMS-936558)), **mAb 2 de PD-1** (MK-3475; Merck, lambrolizumab), **mAb 3 de PD-1** (EH12.2H7; Dana Farber) y **mAb 4 de PD-1** (CT-011; CureTech, BAT-1).

[0078] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 1 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:2**) (los CDR se muestran subrayados):

10 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV
IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND
DYWGQGTLVT VSS

[0079] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de **mAb 1 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:3**) (los CDR se muestran subrayados):

15 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFGSGSGSTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
 GTKVEIK

[0080] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 2 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:4**) (los CDR se muestran subrayados):

20 QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMG
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

25 [0081] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de

Cadena Ligera de **mAb 2 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:5**) (los CDR se muestran subrayados):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RASKGVS** **TSGYSYLHWY** QQKPGQAPRL

LIY**LASYLES** GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YC**QHSRDLPL**

5 **TFGGGTKVEIK**

[0082] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 3 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:6**) (los CDR se muestran subrayados):

QVQLQQSGAE LAKPGASVQM SCKAS**GYSFT** **SSWIHW**VKQR PGQGLEWIGY

10 **IYPSTGFTEY** **NQKFKD**KATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCAR**RWR**

DSSGYHAMDY WGQGTSTVTSS

[0083] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de **mAb 3 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:7**) (los CDR se muestran subrayados):

15 DIVLTQSPAS LTVSLGQRAT ISC**RASQSVS** **TSGYSYMH**WY QQKPGQPPKL

LIK**FGSNLES** GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YC**QHSWEIPY**

TFGGGTKLEI K

[0084] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 4 de PD-1** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:8**) (los CDR se muestran subrayados):

20 QVQLVQSGSE LKKPGASVKI SCKAS**GYTFT** **NYGMN**WVRQA PGQGLQWMG**W**

INTDSGESTY **AEEFKG**RFVF SLDTSVNTAY LQITSLTAED TGMYFCVR**VG**

YDALDYWGQG TLVTVSS

[0085] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de

25 Cadena Ligera de **mAb 4 de PD-1** tiene la secuencia de

aminoácidos (**SEQ ID NO:9**) (los CDR se muestran subrayados):

EIVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSARSSVS YMHWFQQKPG KAPKLWIYRT
SNLASGVPSR FSGSGSGTSY CLTINSIQPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG TKLEIK

5 B. Capacidades de Unión de Anti-LAG-3

[0086] Los anticuerpos que son inmunoespecíficos para LAG-3 también se conocen (véase, *por ejemplo*, WO 2014/008218). Los anticuerpos deseados adicionales pueden elaborarse al aislar hibridomas de secreción de anticuerpo producidas
 10 utilizando LAG-3 o un fragmento de péptido de los mismos. LAG-3 humano (incluyendo una secuencia de señal de residuos de 28 aminoácidos (mostrada subrayada) y la proteína madura de residuos de 497 aminoácidos) tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:10**):

15	<u>MWEAQFLGLL</u>	<u>FLQPLWVAPV</u>	<u>KPLQPGA</u> EV	VVWAQEGAPA	QLPCSPTIPL
	QDLSLLRRAG	VTWQHQPDSG	PPAAAPGHPL	APGPHPAAPS	SWGPRPRRYT
	VLSVGPGGLR	SGRLPLQPRV	QLDERGRQRG	DFSLWLRPAR	RADAGEYRAA
	VHLRDRALSC	RLRLRLGQAS	MTASPPGSLR	ASDWVILNCS	FSRPDRPASV
	HWFRNRGQGR	VPVRESPHHH	LAESFLFLPQ	VSPMDSGPWG	CILTYRDGFN
20	VSIMYNLTVL	GLEPPTPLTV	YAGAGSRVGL	PCRLPAGVGT	RSFLTAKWTP
	PGGGPDLLVT	GDNGDFTLRL	EDVSQAQAGT	YTCHIHLEQ	QLNATVTLAI
	ITVTPKSFGS	PGSLGKLLCE	VTPVSGQERF	VWSSLDTPSQ	RSFSGPWLEA
	QEAQLLSQPW	QCQLYQGERL	LGAAVYFTEL	SSPGAQRSGR	APGALPAGHL
	LLFLILGVLS	LLLLVTGAFG	FHLWRRQWRP	RRFSALEQGI	HPPQAQSKIE
25	ELEQEPEPEP	EPEPEPEPEP	EPEQL		

[0087] Un anticuerpo anti-LAG-3 preferido es **mAb 1 de LAG-3** (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS). La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 1 de LAG-3** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:11**) (los CDR se muestran subrayados):

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE
INHNGNTNSN PSLKSRVTLS LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFGYS
DYEYNWFDPW GQGTLVTVSS

[0088] La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de **mAb 1 de LAG-3** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 12**) (los CDR se muestran subrayados):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQQKP GQAPRLLTYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
 GTNLEIK

[0089] Como se utiliza en la presente, el término "fragmento de unión de epítipo de un anticuerpo" significa un fragmento de un anticuerpo capaz de unirse inmuno-específicamente a un epítipo. Un fragmento de unión de epítipo puede contener 1, 2, 3, 4, 5 ó los 6 de los Dominios de CDR de tal anticuerpo y, aunque capaz de unirse inmuno-específicamente a tal epítipo, puede mostrar una inmuno-especificidad, afinidad o selectividad hacia tal epítipo que difiere de aquel de tal anticuerpo. De preferencia, sin embargo, un fragmento de unión de epítipo contendrá los 6 de los Dominios de CDR de tal anticuerpo. Un

fragmento de unión de epítipo de un anticuerpo puede ser una cadena de polipéptidos simple (*por ejemplo*, un scFv), o puede comprender dos o más cadenas de polipéptidos, cada una teniendo un término amino y un término carboxilo (*por ejemplo*, un diacuerpo, un fragmento de Fab, un fragmento de Fab₂, *etc.*).

C. Diacuerpos de DART® Preferidos de la Presente Invención

1. Consideraciones Generales

[0090] Los diacuerpos preferidos de la presente invención son diacuerpos Fc-DART® tetravalentes, biespecíficos (**Figura 3**) que se encuentran compuestos de cuatro cadenas de polipéptidos totales. Las cuatro cadenas de polipéptidos comprenden dos polipéptidos que contienen CH2-CH3 (*es decir*, la "primera" y "tercera" cadenas de polipéptidos del diacuerpo) que se acomplejan en conjunto para formar un Dominio de Fc y dos polipéptidos que no contienen CH3 idénticos (*es decir*, la "segunda" y "cuarta" cadenas de polipéptidos del diacuerpo), cada una de las cuales se acompleja con un polipéptido que contiene CH2-CH3 del diacuerpo para formar un Dominio de Unión de Epítipo que es inmuno-específico para PD-1 o LAG-3. De esta manera, por ejemplo, la primera cadena de polipéptidos contendrá un Dominio de Cadena Ligera Variable (VL) anti-PD-1 (o anti-LAG-

3) y un Dominio de Cadena Pesada Variable (VH) anti-LAG-3 (o anti-PD-1), y se acomplejará con una segunda cadena de polipéptidos que posee un Dominio de VH anti-PD-1 (o anti-LAG-3) complementario o un Dominio de VL anti-LAG-3 (o anti-PD-1) complementario, para formar un primer par de Dominios de Unión de Epítipo PD-1 y LAG-3. Igualmente, la tercera cadena de polipéptidos contendrá un Dominio de Cadena Ligera Variable (VL) anti-PD-1 (o un anti-LAG-3) y un Dominio de Cadena Pesada Variable (VH) anti-LAG-3 (o un anti-PD-1), y se acomplejará con una cuarta cadena de polipéptidos que posee un Dominio de VH anti-PD-1 (o anti-LAG-3) complementario o un Dominio de VL anti-LAG-3 (o anti-PD-1) complementario, para formar un segundo par de Dominios de Unión de Epítipo PD-1 y LAG-3.

15 **[0091]** Puesto que los Dominios de Cadena Ligera Variable y Cadena Pesada Variable del mismo polipéptido se dirigen hacia epítopos diferentes, no se acomplejan en conjunto para formar un Dominio de Unión de Epítipo que sea capaz de unir ya sea PD-1 o LAG-3. Los Dominios de Cadena Ligera Variable y Cadena Pesada Variable del primer polipéptido se separan de preferencia del otro por un péptido enlazador de intervención que es lo suficientemente corto como para impedir sustancialmente el acomplejamiento de estos Dominios. Un enlazador ejemplar, tiene la secuencia (**SEQ ID NO:13:**
25 GGGSGGGG. Otros enlazadores de longitud similar (para impedir

que interactúen entre sí los Dominios de VL y VH de la misma cadena de polipéptidos) pueden emplearse alternativamente.

[0092] Como se muestra en la **Figura 4**, la mayoría de los diacuerpos Fc-DART® tetravalente, biespecíficos preferidos de la presente invención son diacuerpos Fc-DART® que se han modificado para contener Dominios de Promoción de Heterodímero. La inclusión de tales Dominios fomenta la formación de heterodímero entre las cadenas de polipéptidos del diacuerpo. La inclusión de tales Dominios no es esencial, y la presente invención incluye diacuerpos biespecíficos de PD-1 x LAG-3 que no poseen tales Dominios. Los Dominios de Promoción de Heterodímero preferidos incluyen Dominios de “**E-hélice**” (SEQ ID NO:14): EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK, y Dominios de “**K-hélice**” (SEQ ID NO:15): KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE. Más específicamente, un par de cadenas de polipéptidos que se desean para acomplejar en conjunto se diseñan por ingeniería para contener uno (o más) de tales Dominios de Promoción de Heterodímero, con los Dominios empleados de una cadena de polipéptidos que es complementario con los Dominios empleados de otra cadena de polipéptidos (por ejemplo, una cadena de polipéptidos contendrá un Dominio de E-hélice y la otra contendrá un Dominio de K-hélice). En donde las dos cadenas de polipéptidos se diseñan para contener más de uno de tales Dominios de Promoción de Heterodímero, que pueden ser de la

misma carga o de mayor preferencia, de carga opuesta.

[0093] Particularmente preferidos son los Dominios de Promoción de Heterodímero que comprenden modificaciones de las secuencias de E-hélice y K-hélice descritas en lo anterior para incluir uno o más residuos de cisteína. La presencia de tales residuos de cisteína permite que la hélice presente en una cadena de polipéptidos llegue a enlazarse covalentemente con una hélice complementaria presente en otra cadena de polipéptidos, enlazando covalentemente por consiguiente las cadenas de polipéptidos entre sí e incrementando la estabilidad del diacuerpo. Ejemplos de tales Dominios de Promoción de Heterodímero particularmente preferidos incluyen una E-Hélice Modificada que tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:16**):

15 EVAACCEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK, en donde un residuo de leucina de **SEQ ID NO:14** se ha remplazado con un residuo de cisteína (mostrado subrayado), una K-Hélice Modificada que tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:17**):

20 KVAACCKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE, en donde un residuo de leucina de **SEQ ID NO:15** se ha remplazado con un residuo de cisteína (mostrado subrayado).

[0094] El Dominio de Cadena Pesada Variable del primer polipéptido y el Dominio de Promoción de Heterodímero de ese polipéptido se separan de preferencia entre sí por un péptido enlazador de intervención que contiene 1, 2, 3 o más residuos

25

de cisteína. Un péptido espaciador preferido que contiene cisteína tiene la secuencia **SEQ ID NO:18:** GGCGGG. Otros enlazadores de longitud similar (para incluir un residuo de cisteína pueden enlazarse covalentemente con el residuo de

5 cisteína de otra cadena de polipéptidos) puede emplearse.

[0095] De preferencia, el Dominio de Promoción de Heterodímero empleado y el Dominio de CH2-CH3 de la primera cadena de polipéptidos se separan entre sí por un péptido enlazador que contiene cisteína de intervención que

10 proporciona estabilización mejorada al Dominio de Promoción de Heterodímero. Un péptido enlazador que contiene cisteína adecuado tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 19**): DKTHTCPPCP, sin embargo, un enlazador más preferido tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:20**): LEPKSADKTHTCPPC.

15 Otros enlazadores de longitud similar (para incluir un residuo de cisteína que puede enlazarse covalentemente con un residuo de cisteína de otra cadena de polipéptidos) pueden emplearse alternativamente.

[0096] La secuencia de aminoácidos del Dominio de CH2-CH3

20 de tipo Silvestre es como sigue (colocaciones como en el índice de UE como en Kabat et al. (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication No. 91-3242) (**SEQ ID NO:21**):

5

CH2 →					
PAPELLGGPS 230	VFLFPPKPKD 240	TLMISRTPEV 250	TCVVVDVSHE 260	DPEVKFNWYV 270	DGVEVHNAKT 280
←CH2 CH3→					
KFREEQYNST 290	YRVSVLTVL 300	HQDWLNGKEY 310	KCKVSNKALP 320	APIEKTISKA 330	K GQPREPQVY 340
TLPPSREEMT 350	KNQVSLTCLV 360	KGFYPSDIAV 370	EWESNGQFEN 380	NYKTTTPVLD 390	SDGSFFLYSK 400
←CH3					
LTVDKSRWQQ 410	GNVFSCSVMH 420	EALHNHYTQK 430	SLSLSPGK 440		

[0097] Para diacuerpos triespecíficos o tetraespecíficos (es decir, para diacuerpos cuya primera y tercera cadenas de polipéptidos no son idénticas), es deseable reducir o impedir que ocurra la homodimerización entre los Dominios de CH2-CH3 de las dos primeras cadenas de polipéptidos o entre los Dominios de CH2-CH3 de las dos terceras cadenas de polipéptidos. Para promover la heterodimerización entre la primera y tercera cadenas de polipéptidos, el Dominio de CH2-CH3 de estas cadenas se modifica de preferencia para promover tal heterodimerización. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos (de preferencia, una sustitución con un aminoácido que comprende un grupo lateral voluminoso que forma una 'protuberancia', por ejemplo, triptófano) puede introducirse en el Dominio de CH2 o CH3 de la primera cadena de polipéptidos de manera que la interferencia estérica evitará la interacción con un Dominio similarmente mutado y obligará al Dominio mutado a formar un par con un Dominio en el cual se ha diseñado una mutación complementaria o de

adaptación, es decir, 'el agujero' (por ejemplo, una sustitución con glicina). Tales conjuntos de mutaciones pueden diseñarse en cualquier par de polipéptidos que comprenden la molécula del diacuerpo, y además diseñados en cualquier porción de las cadenas de polipéptidos del par. Los métodos de ingeniería de proteína para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización son bien conocidos en la técnica, en particular con respecto al diseño de moléculas similares a inmunoglobulina, y se abarcan en la presente (véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 7,695,936 y Publicación de Patente 2007/ 0196363, Ridgway et al. (1996) "'Knobs-Into- Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization", Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library", J. Mol. Biol. 270: 26- 35, y Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis", J. Immunol. Methods 296:95-101; cada uno de los cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad. Una protuberancia preferida se crea al modificar un Dominio de Fc de IgG nativo para contener la modificación T366W. Un orificio preferido se crea al modificar un Dominio de Fc de IgG nativo para contener la modificación T366S, L368A y Y407V. Para ayudar a purificar los diacuerpos de la

presente invención, la cadena de polipéptidos que contiene las mutaciones de orificios adicionalmente comprenden una sustitución en la posición 435 (H435R) para remover el sitio de unión de Proteína A. De esta manera, los homodímeros de polipéptidos que contienen las mutaciones de orificios no se unirán a la proteína A, mientras que los diacuerpos que se forman como resultado de la protuberancia y el orificio que contiene los heterodímeros retendrá su capacidad para unirse a la proteína A mediante el sitio de unión de proteína A sobre la cadena de polipéptidos que contiene la mutación de protuberancia.

[0098] La invención también abarca moléculas que comprenden Dominios de Fc variantes que comprenden una o más sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos en relación con un Dominio de Fc de tipo silvestre comparable. Las moléculas que comprenden los Dominios de Fc variantes normalmente han alterado los fenotipos en relación con las moléculas que comprenden los Dominios de Fc de tipo silvestre. El fenotipo variante puede expresarse como vida media de suero alterada, estabilidad alterada, susceptibilidad alterada a enzimas celulares o función efectora alterada como se prueba en un ensayo dependiente de macrófago o dependiente de NK. Las modificaciones del Dominio de Fc identificadas como función efectora alternante se conocen en la técnica, que incluyen modificaciones que

incrementan la unión a los receptores de activación (por ejemplo, FcγRIIA (CD16A) y reduce la unión a receptores inhibidores (por ejemplo, FcγRIIB (CD32B) (véase, por ejemplo, Stavenhagen, J.B. et al. (2007) "*Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγgamma Receptors*", Cancer Res. 57(18):8882-8890). Variantes ejemplares de los Dominios de Fc de IgG 1 con la unión reducida de CD32B y/o la unión incrementada a CD16A contiene sustituciones F243L, R929P, Y300L, V305I o P296L. Estas sustituciones de aminoácidos pueden estar presentes en un Dominio de Fc de IgG1 humano en cualquier combinación. En una modalidad, la variante del Dominio de Fc de IgG1 humano contiene una sustitución de F243L, R929P y Y300L. En otra modalidad, la variante del Dominio de Fc de IgG1 humano contiene una sustitución de F243L, R929P, Y300L, V305I y P296L. En otra modalidad, la variante del Dominio de Fc de IgG1 humano contiene una sustitución de N297Q, sustituciones de L234A y L235A o una sustitución de D265A, cuando estas mutaciones suprimen la unión de FcR. El dominio de CH2-CH3 de la primera cadena de polipéptidos de tales moléculas tendrá la secuencia **"que lleva la protuberancia"** (SEQ ID NO:22):

PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP

APIEKTTSKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV
 EWESNGQOPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 EALHNHYTQK SLSLSPGK

o la secuencia "**que lleva el orificio**" con una sustitución de
 5 H435R para detener la unión de Proteína A (**SEQ ID NO:23**):

PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV
 EWESNGQOPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH

10 EALHNRYTQK SLSLSPGK

[0099] Como se reconocerá, un Dominio de CH2-CH3 "que
 lleva orificio" (*por ejemplo, SEQ ID NO:22*) podría emplearse
 en la primera cadena de polipéptidos, en cuyo caso, un
 15 Dominio de CH2-CH3 "que lleva protuberancia" (*por ejemplo,*
SEQ ID NO:22) puede emplearse en la tercera cadena de
 polipéptidos.

[00100] Para diacuerpos tetraivalentes, biespecíficos de la
 presente invención cuya primera y tercera cadenas de
 20 polipéptidos no son diferentes, un Dominio de CH2-CH3
 preferido es un Dominio de CH2-CH3 Modificado que tiene la
 secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:24**):

PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLYITREPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 25 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV

EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
EALHNHYTQK SLSLSPG

[00101] De esta manera, en resumen, la primera y tercera
cadenas de polipéptidos preferidas de un diacuerpo Fc-DART®
5 tetraivalente, biespecífico de PD-1 x LAG-3 preferido, el
diacuerpo de la presente invención tiene secuencias
idénticas, y la segunda y cuarta cadenas de polipéptidos de
tales diacuerpos Fc-DART® tetraivalentes, biespecíficos de PD-
1 x LAG-3 preferidos tienen secuencias idénticas, como se
10 muestra en la **Tabla 3**:

Tabla 3:

Tabla 3		
Variación	Dominios de la Primera y Tercera Cadenas de Polipéptidos	Dominios de la Segunda y Cuarta Cadenas de Polipéptidos
I	(VL del Dominio de Unión de Epítipo anti-PD-1) – (Enlazador) – (VH del Dominio de Unión de Epítipo anti- LAG-3) – (Enlazador) – (Dominio de Promoción de Heterodímero de E-Hélice Modificado) – (Enlazador) – (Dominio de CH2-CH3 Modificado)	(VL del Dominio de Unión de Epítipo anti-LAG-3) – (Enlazador) – (VH de un Dominio de Unión de Epítipo anti-PD-1) – (Enlazador) – (Dominio de Promoción de Heterodímero de K-Hélice Modificado)
II	(VL del Dominio de Unión de Epítipo anti-PD-1) – (Enlazador) – (VH del Dominio de Unión de Epítipo anti-LAG-3) – (Enlazador) – (Dominio de Promoción de Heterodímero de K-Hélice Modificado) – (Enlazador) – (Dominio de CH2-CH3 Modificado)	(VL del Dominio de Unión de Epítipo anti-LAG-3) – (Enlazador) – (VH de un Dominio de Unión de Epítipo anti-PD-1) – (Enlazador) – (Dominio de Promoción de Heterodímero de E-Hélice Modificado)
III	(VL del Dominio de Unión de Epítipo anti-LAG-3) – (Enlazador) – (VH del Dominio de Unión de Epítipo anti-PD-1) – (Enlazador) – (Dominio de Promoción de Heterodímero de E-Hélice Modificado) – (Enlazador) – (Dominio de CH2-CH3 Modificado)	(VL del Dominio de Unión de Epítipo anti-PD-1) – (Enlazador) – (VH de un Dominio de Unión de Epítipo anti-LAG-3) – (Enlazador) – (Dominio de Promoción de Heterodímero de K-Hélice Modificado)
IV	(VL del Dominio de Unión de Epítipo anti-LAG-3) – (Enlazador) – (VH del Dominio de Unión de Epítipo anti-PD-1) – (Enlazador) – (Dominio de Promoción de Heterodímero de K-Hélice Modificado) – (Enlazador) – (Dominio de CH2-CH3 Modificado)	(VL del Dominio de Unión de Epítipo anti-PD-1) – (Enlazador) – (VH del Dominio de Unión de Epítipo anti-LAG-3) – (Enlazador) – (Dominio de Promoción de Heterodímero de E-Hélice Modificado)

2. Primer Diacuerpo Fc-DART® Biespecífico PD-1 x LAG-3 Ejemplar (Fc-DART®-1 de PD-1 X LAG-3)

[00102] Un primer diacuerpo Fc-DART® tetravalente, biespecífico de PD-1 x LAG-3 particularmente preferido de la presente invención ("**Fc-DART®-1 de PD-1 x LAG-3**") tiene la primera y tercera cadenas de polipéptidos de secuencia idéntica. Tal primera/tercera cadena de polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:25**):

	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSIG	SYLAWYQQKP	GQAPRLLIYD
10	ASNRATGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTISSELP	EDFAVYYCQQ	RSNWPLTFGQ
	GTNLEIKGGG	SGGGGQVQLV	ESGGGVVQPG	RSRLDCKAS	GITFSNSGMH
	WVRQAPGKGL	EWVAVIWDG	SKRYYADSVK	GRFTISRDNS	KNTLFLQMNS
	LRAEDTAVYY	CATNDDYWQ	GTLVTVSSGG	CGGGEVAACE	KEVAALEKEV
	AALEKEVAAL	EKLEPKSADK	THTCPPCPAP	EAAGGPSVFL	FPPKPKDTLY
15	ITREPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV	EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV
	VSVLTVLHQD	WLNGKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ	PREPQVYTLF
	PSREEMTKNQ	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG
	SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCSVMHEAL	HNHYTQKSLS	LSPG

en donde, los residuos de aminoácidos 1-107 son los residuos de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de mAb 1 de **LAG-3 (SEQ ID NO:12)**, los residuos de aminoácidos 108-115 son los residuos de aminoácidos del enlazador GGGSGGGG (**SEQ ID NO:13**), los residuos de aminoácidos 116-228 son los residuos de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 1 de PD-1 (SEQ ID NO:2)**, los residuos de aminoácidos

229-234 son los residuos de aminoácidos del péptido espaciador que contiene cisteína GGCGGG (**SEQ ID NO:18**), los residuos de aminoácidos 235-262 son los residuos de aminoácidos de E-Hélice Modificada (**SEQ ID NO:16**), los
 5 residuos de aminoácidos 263-277 son los residuos de aminoácidos del péptido enlazador que contiene cisteína LEPKSADKTHTCPPC (**SEQ ID NO:20**) y los residuos de aminoácidos 278-494 son los residuos de aminoácidos del Dominio de CH2-CH3 Modificado (**SEQ ID NO:24**).

10 **[00103]** Una molécula de ácido nucleico que codifica una primera/tercera cadena de polipéptidos es (**SEQ ID NO:26**):

	gaaattgtcc	tgacacagtc	tcccgcaacc	ctgagtttga	gtcctgggga
	gcgagcaact	ctctcctgcc	gagcctccca	gagtatctcc	tcctacctcg
	cctggtacca	acagaagcca	gggcaggctc	caaggctgct	tatctatgac
15	gcctctaacc	gcgcaactgg	gattcccgca	cgcttctccg	gctctgggtc
	cggcacagac	tttacactta	ctatctctag	cctggagcca	gaagactttg
	ccgtgtacta	ttgtcagcaa	cgttccaatt	ggccccttac	ctttgggcag
	ggcactaact	tggaaatcaa	aggtggcgga	tccggcggcg	gaggccaggt
	tcagctggtc	gagagtgggtg	gcggcgttgt	gcaacctggg	cgttccctcc
20	gattggactg	taaagcttcc	ggcattactt	tctcaaattc	cggcattgcat
	tgggtgaggc	aagcccctgg	aaaagggtc	gaatgggtgg	ctgtgatttg
	gtacgatggc	agcaaacggt	actacgccga	ttctgttaag	ggccgcttta
	ccatctcccg	cgataactca	aagaacacac	tgtttctgca	aatgaatagt
	cttagagccg	aggacaccgc	cgtgtactac	tgtgccacaa	atgacgatta
25	ttgggggcag	ggcacattgg	tcacagtgtc	ttccggagga	tgtggcggtg

```

gagaagtggc   cgcatgtgag   aaagaggttg   ctgcttttga   gaaggagggtc
gctgcacttg   aaaaggaggt   cgcagccctg   gagaaactgg   agcccaaadc
tgctgacaaa   actcacacat   gccaccctg   cccagcacct   gaagccgcgg
ggggaccgtc   agtcttcctc   ttccccccaa   aaccaagga   caccctctat
5  atcaccggg   agcctgaggt   cacatgcgtg   gtggtggacg   tgagccacga
   agaccctgag   gtcaagttca   actggtacgt   ggacggcgtg   gaggtgcata
   atgccaagac   aaagccgcgg   gaggagcagt   acaacagcac   gtaccgtgtg
   gtcagcgtcc   tcaccgtcct   gcaccaggac   tggctgaatg   gcaaggagta
   caagtgcaag   gtctccaaca   aagccctccc   agccccatc   gagaaaacca
10  tctccaaagc   caaagggcag   ccccgagaac   cacaggtgta   caccctgccc
   ccatcccg   aggagatgac   caagaaccag   gtcagcctga   cctgcctggg
   caaaggcttc   tatcccagcg   acatcgccgt   ggagtgggag   agcaatgggc
   agccggagaa   caactacaag   accacgcctc   ccgtgctgga   ctccgacggc
   tccttcttcc   tctacagcaa   gctcaccgtg   gacaagagca   ggtggcagca
15  ggggaacgtc   ttctcatgct   ccgtgatgca   tgaggctctg   cacaaccact
   acacgcagaa   gagcctctcc   ctgtctccgg   gt

```

[00104] La segunda y cuarta cadenas de polipéptidos de **Fc-DART®-1 de PD-1 x LAG-3** tienen secuencias idénticas. La segunda /cuarta cadenas de polipéptidos tienen la secuencia

20 de aminoácidos (**SEQ ID NO:27**):

```

EIVLTQSPAT   LSLSPGERAT   LSCRASQSVS   SYLAWYQQKP   GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA   RFSGSGSGTD   FTLTISSLEP   EDFAVYYCQQ   SSNWPRTFGQ
GTKVEIKGGG   SGGGGQVQLQ   QWGAGLLKPS   ETLSLTCAVY   GGSFSDYYWN
WIRQPPGKGL   EWIGEINHNG   NTNSNPSLKS   RVTLSLDTSK   NQFSLKLRSV
25  TAADTAVYYC   AFGYSDYEYN   WFDPWGQGTL   VTVSSGGCGG   GKVAACKEKV

```

AALKEKVAAL KEKVAALKE

en donde, los residuos de aminoácidos 1-107 son los residuos de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de **mAb 1 de PD-1 (SEQ ID NO:3)**, los residuos de aminoácidos 108-115
 5 son los residuos de aminoácidos del enlazador GGGSGGGG (**SEQ ID NO:13**), los residuos de aminoácidos 116-235 son los residuos de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 1 de LAG-3 (SEQ ID NO:11)**, los residuos de aminoácidos 236-241 son los residuos de aminoácidos del péptido
 10 espaciador que contiene cisteína GGCGGG (**SEQ ID NO: 18**), y los residuos de aminoácidos 242-269 son los residuos de aminoácidos de K-Hélice Modificada (**SEQ ID NO: 17**).

[00105] Una molécula de ácido nucleico que codifica una segunda/cuarta cadena de polipéptidos es (**SEQ ID NO:28**):

15	gagatcgtac	ttacccagtc	tcccgccacc	ctttccctga	gtcctggtga
	gcgggccact	ctttcctgtc	gcgcaagcca	atcagtttct	agctacctcg
	catggtatca	gcagaagcca	gggcaggcac	ccaggcttct	catctatgac
	gccagtaacc	gcgcaaccgg	gatacctgct	agatttttccg	gcagtggatc
	tgggaccgat	ttcacactga	caatttcatc	cttggaacca	gaagatttcg
20	cagtctacta	ctgccagcaa	tcttccaact	ggccaagaac	tttcggacag
	gggaccaaag	tggaaattaa	aggtggcgga	tccggcggcg	gaggccaggt
	ccagctccag	caatggggag	ccgggctgct	gaaaccctct	gaaacactga
	atctcacata	taccatztat	aaaacrttcct	tctccaatta	ttactaaaac
	tggattcgtc	agcctcccgg	caagggcctg	gagtggatcg	gtgagattaa
25	ccacaatggc	aataccaata	gcaatcctag	tttgaaatct	cgcgtcactc

tttccctcga tacaagcaaa aaccagtttt ctttgaaatt gcgatctgta
 actgctgctg atactgccgt gtattactgc gcattcggct actccgacta
 tgaatataat tggttcgatc cttggggaca gggaacattg gtaaccgtgt
 catccggagg atgtggcggt ggaaaagtgg ccgcatgtaa ggagaaagtt
 5 gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt aaggaaaagg tcgcagccct
 gaaagag

**3. Segundo Diacuerpo Fc-DART® Biespecífico de PD-1
 x LAG-3 Ejemplar (Fc-DART®-2 de PD-1 X LAG-3)**

10 **[00106]** Un segundo diacuerpo Fc-DART® tetraivalente,
 biespecífico de PD-1 x LAG-3 particularmente preferido de la
 presente invención p **(Fc-DART®-2 de PD-1 x LAG-3)** tiene
 primera y tercera cadenas de polipéptidos de secuencia
 idéntica. La primera/tercera cadena de polipéptidos tiene la
 15 secuencia de aminoácidos **(SEQ ID NO:29)** :

EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTISSELP	EDFAVYYCQQ	SSNWPRTFGQ
GTKVEIKGGG	SGGGGQVQLQ	QWGAGLLKPS	ETLSLTCAVY	GGSFSDYYWN
WIRQPPGKGL	EWIGEINHNG	NTNSNP SLKS	RVTLSLDTSK	NQFSLKLRSV
20 TAADTAVYYC	AFGYSDYEYN	WFDPWGQGTL	VTVSSGGCGG	GEVAACEKEV
AALEKEVAAL	EKEVAALEKL	EPKSADKTHT	CPPCPAPEAA	GGPSVFLFPP
KPKDTLYITR	EPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ
YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSR	EEMTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTTTP
25 PVLDS DGSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP

G

en donde, los residuos de aminoácidos 1-107 son los residuos de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de **mAb 1 de PD-1 (SEQ ID NO:3)**, los residuos de aminoácidos 108-115
 5 son los residuos de aminoácidos del enlazador GGGSGGGG (**SEQ ID NO:13**), los residuos de aminoácidos 116-235 son los residuos de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 1 de LAG-3 (SEQ ID NO:11)**, los residuos de aminoácidos 236-241 son los residuos de aminoácidos del péptido
 10 espaciador que contiene cisteína GGCGGG (**SEQ ID NO:18**), los residuos de aminoácidos 242-269 son los residuos de aminoácidos de E-Hélice Modificado (**SEQ ID NO:16**), los residuos de aminoácidos 270-284 son los residuos de aminoácidos del péptido enlazador que contiene cisteína
 15 LEPKSADKTHTCPPC (**SEQ ID NO:20**) y los residuos de aminoácidos 285-501 son los residuos de aminoácidos del Dominio de CH2-CH3 Modificado (**SEQ ID NO:24**).

[00107] Una molécula de ácido nucleico que codifica la primera/tercera cadena de polipéptidos es (**SEQ ID NO:30**):

20	gagatcgtac	ttacccagtc	tcccgccacc	ctttccctga	gtcctgggtga
	gcggggccact	ctttcctgtc	gcgcaagcca	atcagtttct	agctacctcg
	catggtatca	gcagaagcca	gggcaggcac	ccaggcttct	catctatgac
	gccagtaacc	gcgcaaccgg	gatacctgct	agattttccg	gcagtggatc
	tgggaccgat	ttcacactga	caatttcatc	cttggaacca	gaagatttcg
25	cagtctacta	ctgccagcaa	tcttccaact	ggccaagaac	tttcggacag

	gggaccaaag	tggaaattaa	aggtggcgga	tccggcggcg	gaggccaggt
	ccagctccag	caatggggag	ccgggctgct	gaaaccctct	gaaacactga
	gtctcacatg	tgccgtttat	ggaggttcct	tctccgatta	ttactggaac
	tggattcgtc	agcctcccgg	caagggcctg	gagtggatcg	gtgagattaa
5	ccacaatggc	aataccaata	gcaatcctag	tttgaaatct	cgcgtcactc
	tttccctcga	tacaagcaaa	aaccagtttt	ctttgaaatt	gcgatctgta
	actgctgctg	atactgccgt	gtattactgc	gcattcggct	actccgacta
	tgaatataat	tggttcgcgc	cttggggaca	gggaacattg	gtaaccgtgt
	catccggagg	atgtggcggt	ggagaagtgg	ccgcatgtga	gaaagagggt
10	gctgctttgg	agaaggaggt	cgctgcactt	gaaaaggagg	tcgcagccct
	ggagaaaactg	gagcccaaata	ctgctgacaa	aactcacaca	tgcccaccgt
	gcccagcacc	tgaagccgcg	gggggaccgt	cagtcttcct	cttcccccca
	aaacccaagg	acaccctcta	tatcaccgcg	gagcctgagg	tcacatgcgt
	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	aactggtacg
15	tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag
	tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga
	ctggctgaat	ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	aaagccctcc
	cagcccccat	cgagaaaacc	atctccaaag	ccaaagggca	gccccgagaa
	ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccgg	gaggagatga	ccaagaacca
20	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatcccagc	gacatcgccg
	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct
	cccgtgctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ctctacagca	agctcaccgt
	ggacaagagc	aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc
	atgaggctct	gcacaaccac	tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg
25	ggt				

[00108] La segunda y cuarta cadena de polipéptidos de **Fc-DART®-2 de PD-1 x LAG-3** tienen secuencias idénticas. La segunda/cuarta cadenas de polipéptidos tienen la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:31**):

```

5  EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG SYLAWYÜQKP GQAPRLLIYD
   ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
   GTNLEIKGGG SGGGGQVQLV ESGGGVVQPG RSLRLDCKAS GITFSNSGMH
   WVRQAPGKGL EWVAVIWYDG SKRYYADSVK GRFTISRDNS KNTLFLQMNS
   LRAEDTAVYY CATNDDYWGQ GTLVTVSSGG CGGGKVAACK EKVAALKEKV
10 AALKEKVAAL KE

```

en donde, los residuos de aminoácidos 1-107 son los residuos de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de **LAG-1 mAb 1 (SEQ ID NO:12)**, los residuos de aminoácidos 108-115 son los residuos de aminoácidos del enlazador GGGSGGGG (**SEQ ID NO:13**), los residuos de aminoácidos 116-228 son los residuos de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de **mAb 1 de PD-1 (SEQ ID NO:2)**, los residuos de aminoácidos 229-234 son los residuos de aminoácidos del péptido espaciador que contiene cisteína GGCGGG (**SEQ ID NO: 18**), y los residuos de aminoácidos 235-262 son los residuos de aminoácidos de K-Hélice Modificada (**SEQ ID NO:17**).

[00109] Una molécula de ácido nucleico que codifica una segunda/cuarta cadena de polipéptidos es (**SEQ ID NO:32**):

```

   gaaattgtcc  tgacacagtc  tcccgcaacc  ctgagtttga  gtcctgggga
25  gcgagcaact  ctctcctgcc  gagcctccca  gagtatctcc  tcctacctcg

```

cctggtacca acagaagcca gggcaggctc caaggctgct tatctatgac
 gcctctaacc gcgcaactgg gattcccgca cgcttctccg gctctgggtc
 cggcacagac ttacactta ctatctctag cctggagcca gaagactttg
 ccgtgtacta ttgtcagcaa cgttccaatt ggccccttac ctttgggcag
 5 ggcactaact tggaaatcaa aggtggcgga tccggcggcg gaggccaggt
 tcagctggtc gagagtgggtg gcggcgttgt gcaacctggg cgttccctcc
 gattggactg taaagcttcc ggcattactt tctcaaattc cggcatgcat
 tgggtgaggc aagcccctgg aaaagggctc gaatgggtgg ctgtgatttg
 gtacgatggc agcaaacggt actacgccga ttctgttaag ggccgcttta
 10 ccatctcccg cgataactca aagaacacac tgtttctgca aatgaatagt
 cttagagccg aggacaccgc cgtgtactac tgtgccacaa atgacgatta
 ttggggggcag ggcacattgg tcacagtgtc ttccggagga tgtggcggtg
 gaaaagtggc cgcatgtaag gagaaagttg ctgctttgaa agagaaggtc
 gccgcactta aggaaaagggt cgcagccctg aaagag

15

III. Composiciones farmacéuticas

[00110] La presente invención incluye composiciones farmacéuticas para el tratamiento de un cáncer o una enfermedad asociada con la presencia de un patógeno. Tales

20 composiciones incluyen composiciones de fármaco a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (*por ejemplo*, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (*es decir*, composiciones que son adecuadas para administración a un sujeto o paciente) que

25 pueden utilizarse en la preparación de formas de dosis

unitaria. Tales composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de un diacuerpo específico de PD-1 x LAG-3 modificado de la presente invención, (y especialmente un diacuerpo Fc-DART® bi-
5 específico tetravalente de PD-1 x LAG-3 de la presente invención) y un portador farmacéuticamente aceptable. De preferencia, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de una o más moléculas de la invención y un portador farmacéuticamente
10 aceptable. La invención también abarca composiciones farmacéuticas que comprenden tales diacuerpos modificados y un segundo anticuerpo terapéutico que es específico para un antígeno asociado con un patógeno particular, y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 **[00111]** Como se utiliza en la presente, el término "**cáncer**" se refiere a una enfermedad caracterizada por la presencia de un tumor maligno. Tales cánceres incluyen un cáncer de glándula adrenal, un cáncer asociado con SIDA, un sarcoma de parte suave alveolar, un tumor astrocítico a cáncer de
20 vejiga, cáncer de hueso, un cáncer de cerebro y médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer de mama, un tumor de cuerpo carotideo, un cáncer cervical, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma cromóforo de células renales, un carcinoma de células transparentes, un cáncer de
25 colón, un cáncer colorectal, un histiocitoma fibroso benigno

cutáneo, un tumor desmoplástico de células pequeñas y redondas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, una fibrogénesis imperfecta ossium, una displasia fibrosa del hueso, un cáncer de la vesícula biliar o conducto biliar, cáncer gástrico, un enfermedad gestacional trofoblástica, un tumor de células germinales, un cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, un tumor de células de islote, un sarcoma de Kaposi, un cáncer de riñón, una leucemia, un tumor de lipoma/lipomatoso benigno, un tumor de liposarcoma/lipomatoso maligno, un cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer de pulmón, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endocrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplástico, un neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, un cáncer de ovario, un cáncer pancreático, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor de paratiroides, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina del nervio periférico, un feocromocitoma, un tumor pituitario, un cáncer de próstata, un melanoma uveal posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer metastásico renal, un tumor rabdoide, un rabdomiosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejido blando, un cáncer de células escamosas, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico, un timoma, un cáncer metastásico de tiroides, o un cáncer uterino.

[00112] Como se utiliza en la presente, el término "enfermedad asociada con la presencia de un patógeno" se refiere a una enfermedad asociada con una infección mediante una bacteria (*por ejemplo*, E. coli, C. difficile, Salmonella thyphimurium, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholerae, Neisseria gonorrhoeae, Helicobacter pylori, Hemophilus influenzae, Shigella dysenteriae, Staphylococcus aureus, Mycobacterium tuberculosis y Streptococcus pneumonia, etc.), un hongo (*por ejemplo*, Candida, Aspergillus, Cryptococcus, Coccidioides, Histoplasma, Pneumocystis, Stachybotrys, etc.), un protozoario (Amoebozoa, Excavata, Chromalveolata, Entamoeba, Plasmodium, Giardia, Trypanosoma, Coccidia, Besnoitia, Dicrocoelium, Leishmania, etc.) o un virus (y especialmente un adenovirus, un adeno-virus asociado, un virus B (herpesvirus macacino I), un virus BK, un bunyavirus, a virus de chikungunya, un virus de cocksackie, un coronavirus, un citomegalovirus, un virus de encefalitis equina del este, un virus de ébola, un enterovirus, un virus de Epstein-Barr, un hantavirus, un virus de hepatitis A, un virus de hepatitis B, un virus de hepatitis C, un virus de hepatitis D, un virus de hepatitis E, un virus 1 de herpes simple, un virus 2 de herpes simple, un virus espumoso humano, un virus 3 de herpes humano, un virus 5 de herpes humano, un virus 6 de herpes humano, un virus 7 de herpes humano, un virus de inmunodeficiencia humana, un

papilomavirus humano, un virus de β -linfotrópico humano, un virus I de leucemia de células T humanas, un virus II de leucemia de células T humano, un virus de influenza, un virus de JC, un JEV, un herpesvirus asociado con el sarcoma de Kaposi, un virus de Lassa, un virus coriomeningitis linfocítica, un virus de Marburgo, un virus del sarampión, un virus de paperas, un virus de Nipah, un norovirus, un virus de Norwalk, un ortoreovirus, un virus de parainfluenza, un parvovirus, un poliovirus, un virus de rabia, un reovirus, un virus sincitial respiratorio, rinovirus, un virus de fiebre del Valle de Rift, un rotavirus, un virus de rubeola, un virus de viruela, un virus de encefalitis de St Louis, un virus mayor de variola, un virus menor de variola, un virus de varicela zoster, un virus de Nilo Occidental, un virus de encefalitis de esquina del oeste, o un virus de fiebre amarilla).

[00113] Como se utiliza en la presente, los términos **"tratamiento"** o **"tratar"** indican un procedimiento para obtener un resultado benéfico o deseado que incluye y de preferencia un resultado clínico benéfico o deseado. Tales resultados clínicos benéficos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de lo siguiente: reducir la proliferación de (o destruir) las células infectadas u otras células enfermas, disminuir los síntomas que resultan de la enfermedad incrementar la calidad de vida de aquellos que

sufren de la enfermedad, disminuir la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad, y/o prolongar la supervivencia de animales receptores de compañía.

5 **[00114]** En una modalidad específica, el término **"farmacéuticamente aceptable"** significa mejorada por una agencia reguladora del Gobierno federal o un estado o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más
10 particularmente en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (*por ejemplo*, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente, o vehículo con el cual se administra el compuesto terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquido estériles, tales como agua y
15 aceites, que incluyen aquellos de petróleo, animal, vegetal o de origen sintético, tal como aceite de cacahuate, aceite de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las soluciones salinas y la
20 dextrosa acuosa y las soluciones de glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, flúor, creta, gel de sílice,
25 estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro

de sodio, leche descremada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes de humectación o emulsificantes, o agentes de regulación de pH.

5 Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, liberaciones de formulaciones sostenidas y similares.

[00115] Generalmente, los ingredientes de las composiciones de la invención se suministran ya sea por separado o
10 mezclados en conjunto en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o saquito que indica la cantidad de agente activo. Donde la composición se administrará por infusión, puede
15 dispensarse con una botella de infusión que contiene un grado farmacéutico estéril de agua o solución salina. Donde la composición se administra por inyección, una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina puede proporcionarse de modo que los ingredientes puedan mezclarse antes de la
20 administración.

[00116] Las composiciones de la invención pueden formularse como formas neutras o sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a aquellas formadas con aniones tal como aquellas derivadas a partir de ácidos
25 clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y

aquellas formadas con cationes tales como aquellos derivados a partir de sodio, potasio, amoniaco, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaina, etc.

5 **[00117]** La invención también proporciona un paquete o equipo farmacéutico que comprende uno o más recipientes que contienen un diacuerpo bi-específico de PD-1 x LAG-3 de la presente invención, solo o con el portador farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente, uno o más de los agentes
10 profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad también pueden incluirse en el paquete o equipo farmacéutico. La invención también proporciona un paquete o equipo farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las
15 composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociados con tales recipientes pueden tener una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, la notificación refleja la aprobación por la
20 agencia de fabricación, uso o venta para administración humana.

[00118] La presente invención proporciona equipos que pueden utilizarse en los métodos anteriores. En una modalidad, un equipo comprende una o más moléculas de la
25 invención. En otra modalidad, un equipo comprende además uno

o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de cáncer o una enfermedad caracterizada por la presencia de un antígeno asociado con patógeno, en uno o más recipientes. En otra modalidad, un equipo comprende además
5 uno o más anticuerpos o diacuerpos que unen uno o más de los antígenos asociados con patógeno. En ciertas modalidades, el otro agente profiláctico o terapéutico es un quimioterapéutico. En otras modalidades, el agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico biológico
10 u hormonal.

IV. Métodos para Producir el Diacuerpo Bi-Específico de PD-1 x LAG-3 de la Presente invención

[00119] Los diacuerpos bi-específicos PD-1 x LAG-3 de la
15 presente invención se producen de mayor preferencia a través de la expresión recombinante de moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos, como se conoce bien en la técnica.

[00120] Los polipéptidos de la invención pueden prepararse
20 convencionalmente utilizando síntesis de péptido de fase sólida (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis", Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At
25 The Level Of Individual Amino Acids", Proc. Natl. Acad. Sci.

(U.S.A.) 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "*Solid- Phase Synthesis In The Twenty-First Century*", Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).

[00121] En una alternativa, los anticuerpos pueden
5 elaborarse recombinantemente y expresarse utilizando
cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos
pueden elaborarse recombinantemente al aislar primero los
anticuerpos elaborados a partir de animales huésped,
obteniendo la secuencia del gen, y utilizando la secuencia
10 del gen para expresar el anticuerpo recombinantemente en la
célula huésped (*por ejemplo*, células CHO). Otro método que
puede emplearse es para expresar la secuencia de anticuerpos
en plantas (*por ejemplo*, tabaco) o leche transgénica. Los
métodos adecuados para expresar anticuerpos recombinantemente
15 en plantas o leche se ha descrito (véase, *por ejemplo*,
Peeters et al. (2001) "*Production Of Anticuerpos And Antibody
Fragments In Plants*", Vaccine 19:2756; Lonberg, N. et al.
(1995) "*Human Antibodies From Transgenic Mice*", Int. Rev.
Immunol 13:65-93; y Pollock et al. (1999) "*Transgenic Milk As
20 A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*", J.
Immunol Methods 231:147-157). Los métodos adecuados para
hacer derivados de un anticuerpo, *por ejemplo*, quimérico,
humanizado, de cadena simple, etc. se conocen en la técnica.
En otra alternativa, los anticuerpos pueden elaborarse
25 recombinantemente por tecnología de despliegue de fago

(véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 6,265,150; y Winter, G. et al. (1994) "*Making Antibodies By Phage Display Technology*", Annu. Rev. Immunol. 12.433-455).

5 **[00122]** Los anticuerpos o proteínas de interés pueden someterse a secuenciación por degradación de Edman, el cual se conoce bien por aquellos con experiencia en la técnica. La información de péptido generada a partir de la espectrometría de masa o la degradación de Edman puede utilizarse para
10 diseñar las sondas o cebadores que se utilizan para clonar la proteína de interés.

[00123] Un método alternativo para clonar la proteína de interés es por "toma panorámica" utilizando proteínas purificadas o porciones de la misma para células que expresan
15 el anticuerpo o proteína de interés. El procedimiento de "toma panorámica" puede conducirse al obtener una biblioteca de ADNc a partir de tejidos o células que expresan o sobre expresan los ADNc deseados en un segundo tipo de célula, y seleccionar las células transfectadas del segundo tipo de
20 células para una unión específica a la proteína deseada. Descripciones detalladas de los métodos utilizados en genes de mamífero de clonación se codifican para las proteínas de superficie celular por "toma panorámica" puede encontrarse en la técnica (véase, por ejemplo, Aruffo, A. et al. (1987)
25 "*Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS*

Cell Expression System", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577 y Stephan, J. et al. (1999) "*Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial*
 5 *Differentiation*", Endocrinol. 140:5841-5854).

[00124] Los anticuerpos que codifican los ADNc, y otros agonistas de péptidos, antagonistas y moduladores pueden obtenerse al transcribir en forma inversa los ARNm de un tipo de célula particular de acuerdo con los métodos estándares en
 10 la técnica. Específicamente, el ARNm puede aislarse utilizando varias enzimas líticas o soluciones químicas de acuerdo con los procedimientos establecidos en Sambrook et al., supra o extraídos por resinas de unión de ácido nucleico comercialmente disponibles seguidas de las instrucciones
 15 juntas proporcionadas por los fabricantes (por ejemplo, Qiagen, Invitrogen, Promega). Los ADNc sintetizados se introducen entonces en un vector de expresión para producir el anticuerpo o proteína de interés en células de un segundo tipo. Se implica que un vector de expresión debe replicarse
 20 en las células huésped ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosomal. Los vectores de expresión adecuados incluyen pero no se limitan a plásmidos, vectores virales, que incluyen adenovirus, adeno-virus asociados, retrovirus, y cósmidos.

25 **[00125]** Los vectores que contienen los polinucleótidos de

interés pueden introducirse en la célula huésped por cualquiera de un número de medios apropiados, que incluyen electroporación, cloruro de calcio que emplea transfección, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, Destrano de DEAE, u
5 otras sustancias; bombardeo de microprojectiles; lipofección; e infección (*por ejemplo*, donde el vector es un agente de infección tal como virus vaccinia). La elección de introducir vectores o polinucléotidos dependerá con frecuencia de las características de la célula huésped.

10 **[00126]** Cualquier célula huésped capaz de sobre expresar los ADN heterólogos puede utilizarse para el propósito de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteínas de interés. Ejemplo no limitantes de células huésped de mamíferos adecuados incluyen, pero no se limitan a
15 células COS, HeLa, y CHO. De preferencia, las células huésped expresan los ADNc en un nivel de aproximadamente 5 veces más, de mayor preferencia 10 veces más, de mayor preferencia 20 veces más, de mayor preferencia 50 veces más, de mayor preferencia 100 veces más que aquel del anticuerpo o
20 proteínas de interés endógena correspondiente, si está presente, en las células huésped. Seleccionar las células huésped para una unión específica a una proteína deseada se afecta de preferencia por un inmunoensayo o FACS. Una célula que sobre expresa el anticuerpo o proteínas de interés puede
25 identificarse de esta manera.

[00127] Diversas técnicas también se encuentran disponibles las cuales pueden ahora emplearse para producir agonistas, antagonistas, y moduladores de péptido mutante que se codifican por adición, supresión, o cambios en la secuencia
5 de aminoácidos de la proteína resultante en relación con la molécula agonista, antagonista o moduladora del péptido original.

[00128] La invención incluye modificaciones al diacuerpo bi-específico de PD-1 x LAG-3 de la invención que no afecta
10 significativamente sus propiedades y variantes que han mejorado o disminuido la actividad. La modificación de los polipéptidos es de rutina práctica en la técnica. Ejemplos de polipéptidos modificados incluyen los polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o
15 más supresiones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente de forma perjudicial la actividad funcional, o uso de análogos químicos. Los residuos de aminoácidos que pueden sustituirse moderadamente entre sí incluye pero no se limitan a: glicina/alanina;
20 valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; serina/treonina; lisina/arginina; y fenilalanina/tirosina. Estos polipéptidos también incluyen polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como también polipéptidos con otras modificaciones post translacionales,
25 tales como, por ejemplo, glicosilación con diferentes

azúcares, acetilación, y fosforilación. De preferencia, las sustituciones de aminoácidos pueden conservarse, *es decir*, los aminoácidos sustituidos pueden poseer propiedades químicas similares como aquellas de los aminoácidos originales. Tales sustituciones conservadoras se conocen en la técnica, y los ejemplos se han proporcionado en lo anterior. Las modificaciones de aminoácidos pueden variar desde cambiar o modificar uno o más aminoácidos hasta el rediseño completo de una región, tal como la región variable.

Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad de unión y/o especificidad. Otros métodos de codificación incluyen utilizar técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, medios enzimáticos, sustitución y quelación oxidativa. Las modificaciones pueden utilizarse, por ejemplo, para la conexión de etiquetas para inmunoensayo, tal como la conexión de porciones radioactivas para radioinmunoensayo. Los polipéptidos modificados se hacen utilizando procedimientos establecidos en la técnica y pueden seleccionarse utilizando ensayos estándar conocidos en la técnica.

[00129] La invención también abarca las proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones a partir de los polipéptidos y anticuerpos de esta invención. En una modalidad, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la región de

cadena ligera variable y al menos 10 aminoácidos de la región de cadena pesada variable. En otra modalidad, el polipéptido de fusión contiene una región constante de inmunoglobulina heteróloga. En otra modalidad, el polipéptido de fusión
5 contiene una Región Variable de Cadena Ligera y una Región Variable de Cadena Pesada de un anticuerpo producido a partir de un hibridoma depositado públicamente. Para propósitos de esta invención, una proteína de fusión de anticuerpo contiene uno o más Dominios de polipéptido que específicamente se unen
10 a un epítipo viral deseado o un receptor de activación deseado de una célula efectora inmune o una proteína presente en la superficie de una célula efectora inmune que expresa tal receptor de activación y otra secuencia de aminoácidos a la que no se conecta en la molécula nativa, por ejemplo, una
15 secuencia heteróloga o una secuencia homologa a partir de otra región.

[00130] La invención incluye polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de esta invención. Los polipéptidos de esta invención pueden
20 elaborarse por procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden producirse por degradación proteolítica u otra de los anticuerpos, por métodos recombinantes (*es decir*, polipéptidos simples o de fusión) como se describe en lo anterior o por síntesis química. Los polipéptidos de los
25 anticuerpos, especialmente los polipéptidos más cortos hasta

aproximadamente 50 aminoácidos, se elaboran convenientemente por síntesis química. Los métodos de síntesis química se conocen en la técnica y se encuentran comercialmente disponibles. Por ejemplo, tal polipéptido podría producirse
5 por un sintetizador de polipéptido automatizado que emplea el método de fase sólida.

V. Usos de las Composiciones de la Invención

[00131] La presente invención abarca composiciones, que
10 incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente invención, los polipéptidos derivados a partir de tales moléculas, polinucléotidos que comprenden secuencias que codifican tales moléculas o los polipéptidos, y otros agentes
15 como se describe en la presente.

[00132] En que los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente invención tienen la habilidad atenuada a la inhibición del sistema inmune mediado por PD-1 y LAG-3, los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente
20 invención pueden utilizarse para tratar cualquier enfermedad o padecimiento asociado con un sistema inmune indeseablemente suprimido, que incluye cáncer y enfermedades que se encuentran asociadas con la presencia de un patógeno (*por ejemplo, una infección por bacteria, hongos, virus o*
25 *protozoario*).

VI. Métodos de Administración

[00133] Las composiciones de la presente invención pueden proporcionarse por el tratamiento, profilaxis, y mejora de uno o más síntomas asociado con una enfermedad, trastorno o
5 infección al administrar a un sujeto una cantidad efectiva de una composición farmacéutica de la invención. En un aspecto preferido, tales composiciones se purifican sustancialmente (*es decir*, sustancialmente libres de sustancias que limitan su efecto o producen efectos colaterales indeseados). En una
10 modalidad específica, el sujeto es un animal, de preferencia un mamífero tal como un no primate (*por ejemplo*, bovino, equino, felino, canino, roedor, *etc.*) o un primate (*por ejemplo*, mono tal como, un mono cinomolgus, humano, *etc.*). En una modalidad preferida, el sujeto es un humano.

15 [00134] Diversos sistemas de suministro se conocen y pueden utilizarse para administrar las composiciones de la invención, *por ejemplo*, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis
20 mediada por el receptor (Véase, *por ejemplo*, Wu *et al.* (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System", J. Biol. Chem. 262:4429-4432), la construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, *etc.*

25 [00135] Los métodos de administración de anticuerpos bi-

específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural, y mucosal (por ejemplo, intranasal y rutas orales). En una modalidad específica, las moléculas de la invención se administran intramuscular, intravenosa, o subcutáneamente. Las composiciones pueden administrarse por cualquier ruta conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, la administración pulmonar también puede emplearse, por ejemplo, por el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosol. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y Publicaciones de PCT Nos. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

[00136] La invención también proporciona que los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente invención pueden empacarse en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o saquitos que indican la cantidad de tales

moléculas. En una modalidad, los diacuerpos bi-específicos de PD-1 X LAG-3 de la presente invención se suministran como un polvo liofilizado esterilizado en seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado y puede
5 reconstituirse, *por ejemplo*, con agua o solución salina a la concentración apropiada para administración a un sujeto. De preferencia, los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente invención se suministran como polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado en una
10 dosis unitaria de al menos 5 μg , de mayor preferencia al menos 10 μg , al menos 15 μg , al menos 25 μg , al menos 50 μg , al menos 100 μg , o al menos 200 μg .

[00137] Los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 liofilizados de la presente invención deben almacenarse entre
15 2 y 8°C en su recipiente original y las moléculas deben administrarse dentro de 12 horas, de preferencia dentro de 6 horas, dentro de 5 horas, dentro de 3 horas, o dentro de 1 hora después de que se reconstituya. En una modalidad alternativa, los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de
20 la presente invención se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión, o molécula conjugada. De preferencia, la forma líquida de los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente invención se
25 suministra en un recipiente herméticamente sellado en el que

las moléculas se encuentran presentes en una concentración de al menos 1 µg/ml, de mayor preferencia al menos 2.5 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 50 µg/ml, o al menos 100 µg/ml.

5 **[00138]** Como se utiliza en la presente, una "**cantidad efectiva**" de una composición farmacéutica, en una modalidad, es una cantidad suficiente para efecto de resultados benéficos o deseados que incluyen, sin limitación, resultados clínicos tales como síntomas de disminución que resultan de
10 la enfermedad atenuando un **síntoma de la** infección (*por ejemplo*, carga viral, fiebre, dolor, sepsis, etc.) o un síntoma de cáncer (*por ejemplo*, la proliferación, de células cancerígenas, presencia tumoral, metástasis tumoral, etc.), incrementando por consiguiente la calidad de vida de aquellos
15 que sufren de la enfermedad, disminuyendo la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, mejorar el efecto de otros medicamentos tal como mediante la selección y/o internalización, retrasando la progresión de la enfermedad, y/o prolongando la supervivencia de los
20 individuos.

[00139] Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones. Para propósitos de esta invención, una cantidad efectiva de fármaco, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para reducir la
25 proliferación de (o el efecto de) presencia viral y para

reducir y/o retardar el desarrollo de la enfermedad viral, ya sea directa o indirectamente. En algunas modalidades, una cantidad efectiva de un fármaco, compuesto, o composición farmacéutica puede o no lograrse junto con otro fármaco, compuesto, o composición farmacéutica. De esta manera, una "cantidad efectiva" puede considerarse en el contexto de administrar uno o más agentes quimioterapéuticos, y un agente simple puede considerarse para darse en una cantidad efectiva si, junto con uno o más de otros agentes, puede existir o se logra un resultado deseable. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los márgenes óptimos de cantidades efectivas de cada componente se encuentra dentro de la experiencia de la técnica. La dosificación típica para la administración de anticuerpos comprende una o más dosis unitarias entre 0.1 a 100 mg/kg/peso corporal.

[00140] La cantidad del anticuerpo bi-específico de PD-1 x LAG-3 de la presente invención que será efectiva en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno pueden determinarse por técnicas clínicas estándares. La dosis precisa para emplearse en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y la seriedad del padecimiento, y debe decidirse de acuerdo con los juicios del médico y cada una de las circunstancias del paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis - respuesta derivada in vitro o sistemas de

prueba de modelo animal. Para los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente invención, la dosis administrada a un paciente es típicamente al menos aproximadamente 0.01 $\mu\text{g/kg}$, al menos aproximadamente 0.05 $\mu\text{g/kg}$, al menos aproximadamente 0.1 $\mu\text{g/kg}$, al menos aproximadamente 0.2 $\mu\text{g/kg}$, al menos aproximadamente 0.5 $\mu\text{g/kg}$, al menos aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$, al menos aproximadamente 2 $\mu\text{g/kg}$, al menos aproximadamente 5 $\mu\text{g/kg}$, al menos aproximadamente 10 $\mu\text{g/kg}$, al menos aproximadamente 20 $\mu\text{g/kg}$, al menos aproximadamente 50 $\mu\text{g/kg}$, al menos aproximadamente 0.1 mg/kg, al menos aproximadamente 1 mg/kg, al menos aproximadamente 5 mg/kg, al menos aproximadamente 10 mg/kg, al menos aproximadamente 30 mg/kg, al menos aproximadamente 50 mg/kg, al menos aproximadamente 75 mg/kg, al menos aproximadamente 100 mg/kg, al menos aproximadamente 125 mg/kg, al menos aproximadamente 150 mg/kg o más del peso corporal del sujeto.

[00141] En otra modalidad, al paciente se administra un régimen de tratamiento que comprende una o más dosis de tal cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente invención, en donde el régimen de tratamiento se administra durante 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días. En ciertas modalidades, el régimen de tratamiento comprende administrar intermitentemente dosis de la cantidad

profiláctica o terapéuticamente efectiva de los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente invención (por ejemplo, administrar una dosis el día 1, día 2, día 3 y día 4 de una semana determinada y no administrar dosis de la cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente invención el día 5, día 6 y día 7 de la misma semana). Típicamente, existen 1, 2, 3, 4, 5, o más cursos de tratamiento. Cada curso puede ser el mismo régimen o un régimen diferente.

[00142] En otra modalidad, las escalas de dosis administradas durante el primer cuarto, primer medio o primeros dos tercios o tres cuartos de los regímenes (por ejemplo, durante el primer, segundo o tercer regímenes de un tratamiento de 4 cursos) hasta que la cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva diaria de los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 abarcados por la invención se logran.

[00143] En una modalidad, la dosis del diacuerpo bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente invención administrada a un paciente puede calcularse para su uso como una terapia de agente simple. En otra modalidad los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente invención se utilizan en combinación con otras composiciones terapéuticas y la administración de dosis a un paciente son

menores que cuando tales diacuerpos se utilizan como terapia de agente simple.

[00144] En una modalidad específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente al área en necesidad del tratamiento; esto puede lograrse por, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, por inyección, o por medio de un implante, el implante siendo de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialástica, o fibras. De preferencia, cuando se administra una molécula de la invención, debe tenerse cuidado de utilizar materiales al que la molécula no se absorba.

[00145] En otra modalidad, las composiciones pueden suministrarse en una vesícula, en particular liposoma (Véase Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; véase generalmente *ibid.*).

[00146] En aún otra modalidad, las composiciones pueden suministrarse en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida. Cualquier técnica conocida por alguien con experiencia en la técnica puede utilizarse para producir formulaciones de liberación sostenidas que comprenden una o más moléculas de la invención. Véase, *por ejemplo*, la Patente

de los Estados Unidos No. 4,526,938; Publicación de PCT WO 91/05548; Publicación de PCT WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, cada una de las cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad. En una modalidad, una bomba puede utilizarse en un sistema de liberación controlada (Véase Langer, *supra*; Sefton, (1987) "Implantable Pumps", CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201- 240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term. Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis", Surgery 88:507-516; y Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery", N. Engl. J. Med. 321:574-579). En otra modalidad, los materiales poliméricos pueden utilizarse para lograr la liberación controlada de anticuerpos (véase, por

ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);
 5 Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Difosfonate", Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization", Ann. Neurol. 25:351-356;
 10 Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits", J. Neurosurg. 7(1):105-112); Patente de los Estados Unidos No. 5,679,377; Patente de los Estados Unidos No. 5,916,597; Patente de los Estados Unidos No. 5,912,015; Patente de los Estados Unidos No.
 15 5,989,463; Patente de los Estados Unidos No. 5,128,326; Publicación de PCT No. WO 99/15154; y Publicación de PCT No. WO 99/20253). Ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxi etilo),
 20 poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etilen-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(lactido-co-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. En aún otra modalidad,
 25

un sistema de liberación controlada puede colocarse en proximidad del objetivo farmacéutico (por ejemplo, el pulmón), requiriendo de esta manera solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). En otra modalidad, las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada se utilizan de acuerdo con Dunn et al. (Véase U.S. 5,945,155). Este método particular se basa tras el efecto terapéutico de la liberación controlada in situ del material bioactivo a partir del sistema polimérico. La implantación puede ocurrir generalmente en cualquier lado dentro del cuerpo del paciente en necesidad del tratamiento terapéutico. En otra modalidad, se utiliza un sistema de suministro sostenido no polimérico, por lo cual un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto se utiliza como un sistema de suministro de fármaco. Tras la implantación en el cuerpo, el solvente orgánico del implante se disipará, dispersará, o lanzara desde la composición hacia el fluido de tejido circundante, y el material no polimérico coagulará gradualmente o se precipitará para formar un sólido, matriz microporosa (Véase U.S. 5,888,533).

[00147] Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión por Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533). Cualquier técnica conocida por alguien con experiencia en la técnica puede utilizarse para

producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, *por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos No. 4,526,938; las Publicaciones Internacionales Nos. WO 91/05548 y WO 96/20698;

5 Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science &

10 Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local

15 Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, cada uno de los cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

[00148] En una modalidad específica donde la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica una o más de

20 las cadenas de polipéptido de un diacuerpo bi-específico de PD-1 x LAG-3 de la presente invención, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para proporcionar expresión de su diacuerpo codificado, al construirse como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrar de

25 modo que se vuelva intracelular, *por ejemplo*, por el uso de

un vector retroviral (Véase la Patente de los Estados Unidos No. 4,980,286), o por inyección directa, o por el uso de bombardeo de micropartículas (*por ejemplo*, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o el revestimiento con lípidos o
5 receptores de superficie de célula, o agentes de transfección, o al administrarlo se encuentra en un enlace con un péptido similar a homeobox que se muestra al ingresar los núcleos (Véase, *por ejemplo*, Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural
10 Morphogenesis", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868), etc. Alternativamente, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de célula huésped por la expresión por recombinación de homólogo.

15 **[00149]** El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de los diacuerpos bi-específicos de PD-1 x LAG-3 de la presente invención pueden incluir un tratamiento simple o, de preferencia, pueden incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo
20 preferido, un sujeto se trata con moléculas de la invención una vez por semana por entre aproximadamente 1 a 10 semanas, de preferencia entre 2 a 8 semanas, de mayor preferencia entre aproximadamente 3 a 7 semanas, e incluso de mayor preferencia durante aproximadamente 4, 5, o 6 semanas. En
25 otras modalidades, las composiciones farmacéuticas de la

invención se administran una vez al día, dos veces al día, o tres veces al día. En otras modalidades, las composiciones farmacéuticas se administran una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez
 5 cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez por año. También se apreciará que la dosificación efectiva de las moléculas utilizadas para la preparación puede incrementar o disminuir durante el curso de un tratamiento particular.

10 **[00150]** Habiendo descrito ahora generalmente la invención, la misma se entenderá más rápidamente a través de la referencia a los siguientes Ejemplos. Tales Ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que se limiten en la presente invención a menos que se especifique.

15

Ejemplo 1

Producción y Propiedades de Diacuerpos Biespecíficos de PD-1

x LAG-3

[00151] Dentro del contexto del ensayo de alo-MLR, las
 20 células T se inducen para proliferar en respuesta a desacoplar HLA (Latchman, Y.E. et al. (2004) "PD-L1-Deficient Mice Show That PD-L1 On T- Cells, Antigen-Presenting Cells, And Host Tissues Negatively Regulates T-Cells". Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101 (29):10691-10696; Wang, W. et al.
 25 (2008) "PD- L1/PD-1 Signal Deficiency Promotes Allogeneic

Immune Responses And Accelerates Heart Allograft Rejection",
 Transplantation 86(6):836-44) o estimulación
 mitogénica/farmacológica. Los anticuerpos agonistas en las
 moléculas coestimuladoras objetivo se conocen para inducir
 5 respuestas proliferativas para volver a imponer la
 señalización de células T y estabilizar los factores de
 transcripción que promueven o accionan la función efectora de
 células T (Melero, I. et al. (2013) "*Agonist Antibodies to
 TNFR Molecules That Costimulate T and NK Cells*", Clin. Cancer
 10 Res. 19(5): 1044-1053). De manera similar, los anticuerpos
 antagonistas que dirigen las moléculas del punto de control
 inmunológico clave que regula negativamente la respuesta de
 células T puede inducir las respuestas proliferativas al
 mantener la señalización de células T y/o función efectora y
 15 mejorar por consiguiente la inmunidad antitumor (Capece, D.
 et al. (2012) "*Targeting Costimulatory Molecules to Improve
 Antitumor Immunity*", J. Biomed. Biotech. 2012:926321). El
 efecto de los anticuerpos monoclonales contra objetivos co-
 estimuladores o puntos de control inmunológicos sobre la
 20 proliferación en respuesta a aloantígeno puede medirse
 fácilmente en linfocitos mezclados a corto plazo de
 reacciones (alo-MLR) seguido de incorporación de ³H-timidina.
 Para agregar capacidad del anticuerpo contra inhibidor de
 punto de control inmunológico para mejorar la proliferación,
 25 se generaron mAbs anti-PD-1 o anti- LAG-3 del punto de

referencia, purificado, y exógenamente agregado al inicio del ensayo de alo-MLR a 20, 10, 5, 2.5, y 1.25 µg/ml (**Figura 5**). Al final de los 5-6 días, la plaqueta de 96 pozos se pulsó con ³H-timidina y se cultivó durante 18 horas para medir la proliferación. Varios anticuerpos del punto de referencia contra el PD-1 humano, LAG-3, y CTLA-4 se evaluaron en su capacidad para mejorar la proliferación de células T en respuesta a la estimulación alo-antígeno. Como se muestra en la **Figura 6**, la adición de **mAb 1** de **PD-1** (5C4 (BMS-936558), **mAb 2** de **PD-1** (MK-3475; Merck, lambrolizumab), o **mAb 3** de **PD-1** (EH12.2H7; Dana Farber) al comienzo del ensayo de alo-MLR, indujo proliferación de células T fuertes comparadas con el anticuerpo control del isotipo IgG1 o los pozos control que contienen respondedores y estimuladores. Los pozos que contienen células estimuladoras irradiadas solas no demostraron proliferación. Aunque se observó una respuesta proliferativa dependiente de la dosis, **mAb 4** de **PD-1** (CT-011; CureTech, BAT-1) mostró proliferación mínima comparada con **mAb 1** de **PD-1** (5C4 (BMS-936558), **mAb 2** de **PD-1** (MK-3475; Merck, lambrolizumab), o **mAb 3** de **PD-1** (EH12.2H7; Dana Farber). También se observó una respuesta proliferativa dependiente de la dosis leve con **mAb 1** de **LAG-3** (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS), la cual se compara similarmente con ipilimumab de Yervoy®, y el mAb anti-CTLA-4 (Bristol Myers-Squib).

[00152] La efectividad sorprendente de **mAb 1** de **PD-1** (5C4 (BMS-936558), actualmente determinada con **mAb 1** de **LAG-3** (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) para provocar inmunidad anti-tumoral potente en modelos animales cuando se comparan con cualquier anticuerpo determinado solo (Woo, S.R. et al. (2012) "*Immune Inhibitory Molecules LAG-3 And PD-1 Synergistically Regulate T-Cell Function To Promote Tumoral Immune Escape*", Cancer Res. 72(4):917-927), sugiere que los mAb de punto de referencia determinados en combinación pueden potenciar mayor proliferación de células T alo-inducidas que cualquier anticuerpo solo. Como se muestra en la **Figura 7**, se evaluó mAb de anti-LAG-3 (25F7) por su potencial proliferativo ya sea solo o en combinación con los mAb anti-PD-1 (**mAb 1** de **PD-1** (5C4 (BMS-936558) o **mAb 2** de **PD-1** (MK-3475; Merck, lambrolizumab)). Como se observó previamente, ambos mAb de anti-PD-1 indujeron proliferación potente en una forma dependiente de la dosis. En contraste, la provisión de mAb de anti-LAG-3 con cualquier mAb de anti-PD-1 no indujo proliferación mejorada más allá que aquella observada con los mAb de anti-PD-1 solos. El mAb de anti-LAG-3 solo mostró solamente proliferación de células T leve en comparación con el isotipo IgG1 control o respondedor más pozos control estimuladores.

[00153] La incapacidad de los mAb de anti-LAG-3 para inducir proliferación sola o en combinación más allá de aquella

observada con los mAb de anti-PD-1 sugiere que cualquier expresión de LAG-3 se encuentra ausente en las células T durante el ensayo de alo-MLR o que los mAb de anti-LAG-3 no se unen a LAG-3 para bloquear la cascada de señal negativa.

5 Para ensayar el potencial para inducir la transducción de señal de LAG-3, se agregó la proteína de LAG-3 humana soluble ("shLAG-3") al alo-MLR y se comparó contra mAb de anti-LAG-3 y/o los mAb de anti-PD-1. Como se muestra en la **Figura 8**, el LAG-3 humano soluble, el cual se une a las moléculas HLA de

10 clase II humana expresada en ambas de las APC y las células T CD4, indujeron una respuesta proliferativa fuerte comparada con el isotipo de IgG o pozos control del respondedor más estimulador. La adición de **mAb 1 de LAG-3** (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS), no se vio que bloquee el efecto proliferativo

15 de la proteína LAG-3 humana soluble puede tener proliferación de células T ligeramente mejorada, se observó como una respuesta proliferativa dependiente de la dosis ligera. Consistente con la observación previa, mAb de anti-PD-1 indujo proliferación de las células T potente que se mejoró

20 adicionalmente por la adición de la proteína LAG-3 humana soluble y/o **mAb 1 de LAG-3** (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS). Además del control de IgG1 de isotipo a los anticuerpos anti-PD-1 no mejoraron la proliferación de células T más allá de lo que se observa con mAb 1 de PD-1 (5C4 (BMS-936558) solo.

25 La capacidad del volumen LAG-3 no induce proliferación de

células T potentes incluso en la presencia de mAbs de anti-LAG-3 no es claro. Una posibilidad es que el mAb anti-LAG-3 es simplemente capaz de bloquear la señal proliferativa y tensa por mAb de LAG-3 soluble. Una alternativa -- aunque no
 5 necesariamente posibilidad no mutuamente exclusiva -- es que la proteína de LAG-3 humana soluble junto con anti-LAG-3 forma complejos de reticulación inmune que pueden potenciar las respuestas proliferativas.

[00154] La capacidad de LAG-3 soluble para potenciar la
 10 proliferación de células T sugiere que la introducción de ambos mAb de anti-PD-1 y anti-LAG-3 en proximidad cercana puede mejorar la respuesta proliferativa de las células T dentro del alo-ensayo de MLR. Para solucionar esta posibilidad, el punto de referencia de las mAb anti-PD-1 y
 15 anti-LAG-3 se construyeron dentro del redireccionamiento de la afinidad dual del formato bi-específico de (DART®) en dos orientaciones: un diacuerpo Fc-DART® tetravalente bi-específico de **mAb 1 de LAG-3** (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) - **mAb 1 de PD-1** (5C4 (BMS-936558) (**PD-1 x LAG-3 Fc-DART®-1**) y
 20 un **mAb 1 de PD-1** (5C4 (BMS-936558) - **mAb 1 de LAG-3** (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) bi-específico, diacuerpo Fc-DART® tetravalente bi-específico (**Fc-DART®-1 de PD-1 x LAG-3**). Ambos de los formatos Fc-DART® fueron exógenamente agregados (en la menara dependiente de dosis descrita en lo anterior)
 25 en el principio del alo-MLR y se evaluó por su potencial

proliferativo de células T.

[00155] Como se muestra en la **Figuras 9A-9B**, ambos diacuerpos DART® indujeron respuestas proliferativas de células T sorprendentemente más potentes que aquellas obtenidas con **mAb** 5 **1** de **PD-1** (5C4 (BMS- 936558) y/o **mAb** de **LAG-3 1** (25F7; BMS- 986016, Medarex/BMS). LAG-3 humano soluble ("shLAG-3") nuevamente demuestra la proliferación de células T con el alo-ensayo de MLR. La señal proliferativa intensa inducida por DART® y la proteína de LAG-3 humana soluble, minimizaron 10 la contribución de mAb de anti-PD-1 o mAb anti-LAG-3 solo. Aunque ambos mAb anti-PD- 1 y LAG-3s indujeron proliferación de células T en una forma dependiente de la dosis más allá de lo que se observa con el isotipo de IgG1 control o respondedor más pozos estimuladores solos, la combinación de 15 anti-PD-1 con anti-LAG-3 demuestra la proliferación mejorada después de cualquier anticuerpo solo, sugiriendo como informe previo que en la literatura se ha demostrado una sinergia funcional (Wang, W. et al. (2008) "*PD-L1/PD-1 Signal Deficiency Promotes Allogeneic Immune Responses And Accelerates Heart Allograft Rejection*", Transplantation 20 86(6):836-44; Melero, I. et al. (2013) "*Agonist Antibodies to TNFR Molecules That Costimulate T and NK Cells*", Clin. Cancer Res. 19(5): 1044-1053; Capece, D. et al. (2012) "*Targeting Costimulatory Molecules to Improve Antitumor Immunity*", J. 25 Biomed. Biotech. 2012:926321).

[00156] Todas las publicaciones y patentes mencionadas en esta especificación se incorporan en la presente para referencia al mismo grado como si cada publicación individual o solicitud de patente fuera específica e individualmente
5 indicada para incorporarse para referencia en su totalidad. Aunque la invención se ha descrito junto con las modalidades específicas de la misma, se entenderá que es capaz de las modificaciones adicionales y esta aplicación se pretende que cubra cualesquier variaciones, usos o adaptaciones de la
10 invención siguiente, en general, los principios de la invención e incluir tales apartados de la presente descripción que entran dentro de la práctica conocida y habitual dentro la técnica a la cual la invención pertenece y como puede aplicarse a las características esenciales
15 establecidas en lo anterior.