PC72054A

DIACUERPOS HETERODIMÉRICOS BIESPECÍFICOS Y SUS USOS

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica los beneficios de la solicitud provisional U.S Nº 62/019.762, presentada el 1 de julio de 2014, y solicitud provisional U.S. Nº 62/148.920, presentada el 17 de abril de 2015, que se incorporan por referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud se está presentando electrónicamente por medio de EFS-Web e incluye un listado de secuencias presentada electrónicamente en formato .txt. El archivo .txt contiene un listado de secuencias titulado "PC72054A_Secuencia_Listing.txt", creada el 12 de junio de 2015, y que tiene un tamaño de 248 KB. El listado de secuencias contenido en este archivo .txt es parte de la memoria descriptiva y se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a diacuerpos heterodiméricos biespecíficos y sus usos para el tratamiento del cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Se han desarrollado varias estrategias para generar moléculas biespecíficas capaces del reclutamiento de células T para mediar en la muerte de las células tumorales. Sin embargo, los mayores esfuerzos para producir tales moléculas han estado limitados debido a la producción ineficiente y propiedades de estabilidad malas. Para abordar estos problemas, se ha desarrollado una estrategia derivada de Fv basada en una estructura de diacuerpo heterodimérico biespecífico, unido covalentemente, también conocido como proteínas de redireccionamiento de afinidad dual (DART®) (Publicaciones de la solicitud de patente US Nros. 2007/0004909, 2009/0060910, y 2010/0174053).

Aún se necesitan diacuerpos heterodiméricos biespecíficos que superen los desafíos asociados con la generación de anticuerpos biespecíficos y proporcionen agentes altamente específicos y potentes que se unen a las células tumorales que expresan un antígeno blanco y reclutan y activan las células T a través de la activación de CD3, lo que genera un tratamiento innovador y efectivo para el cáncer.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos,

en donde el diacuerpo heterodimérico biespecífico es capaz de unirse específicamente a un epítopo de P-cadherina y a un epítopo de CD3.

La presente invención proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, en donde el diacuerpo heterodimérico biespecífico es capaz de unirse específicamente a un epítopo de P-cadherina y a un epítopo de CD3, en donde el diacuerpo heterodimérico biespecífico comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, en donde: a. el primer polipéptido comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: i. un Dominio 1, que comprende un sub-Dominio 1A y un sub-Dominio 1B, y ii. un primer dominio promotor del heterodímero; y b. la segunda cadena polipeptídica comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: i. un Dominio 2, que comprende un sub-Dominio 2A y un sub-Dominio 2B, y ii. un segundo dominio promotor del heterodímero, y en donde el sub-Dominio 1A y el sub-Dominio 2A forman un dominio de unión VL/VH de P-cadherina que comprende un dominio pesado variable (VH) de un anticuerpo anti-P-cadherina (VH de P-CAD) y un dominio variable liviano (VL) de un anticuerpo anti-P-cadherina (VL de P-CAD), y el sub-Dominio 1B y el sub-Dominio 2B forman un dominio de unión VL/VH de CD3 que comprende un dominio VL de un anticuerpo anti-CD3 (CD3 VL) y un dominio de unión a VH de un anticuerpo anti-CD3 (CD3 VH); o en donde el sub-Dominio 1A y el sub-Dominio 2A forman un dominio de unión VL/VH de CD3 que comprende una VL de CD3 y una VH de CD3, y el sub-Dominio 1B y el sub-Dominio 2B forman un dominio de unión VL/VH de P-cadherina que comprende una VH de P-CAD y una VL de P-CAD.

En otro aspecto de la invención, el sub-Dominio 1A comprende una VL de P-CAD o VL de CD3, y el sub-Dominio 1B comprende una VH de P-CAD, si el sub-Dominio 1A comprende VL de CD3, o una VH de CD3, si el sub-Dominio 1A comprende una VL de P-CAD; y en donde el sub-Dominio 2B comprende una VL de P-CAD o una VL de CD3 de acuerdo con el dominio VL seleccionado para el sub-Dominio 1A, y el sub-Dominio 2A comprende una VH de P-CAD, si el sub-Dominio 2B comprende una VL de CD3, o una VH de CD3, si el sub-Dominio 2B comprende una VL de P-CAD.

En un aspecto particular de la invención, el sub-Dominio 1A comprende una VL de P-CAD y el sub-Dominio 1B comprende una VH de CD3, y el sub-Dominio 2B comprende una VL de CD3 y el sub-Dominio 2A comprende una VH de P-CAD; y en donde la VL de P-CAD del sub-Dominio 1A y la VH de P-CAD del sub-Dominio 2A forma un dominio de unión a VL/VH capaz de unirse específicamente a un epítopo de

P-cadherina, y la VH de CD3 del sub-Dominio 1B y la VL de CD3 del sub-Dominio 2B forman un dominio de unión a VL/VH capaz de unirse específicamente a un epítopo de CD3.

En un aspecto particular, el sub-Dominio 1A comprende una VL de CD3 y el sub-Dominio 1B comprende una VH de P-CAD, y el sub-Dominio 2B comprende una VL de P-CAD y el sub-Dominio 2A una VH de CD3; y en donde la VL de CD3 del sub-Dominio 1A y la VH de CD3 del sub-Dominio 2A forman un dominio de unión a VL/VH capaz de unirse específicamente a un epítopo de CD3, y la VH de P-CAD del sub-Dominio 1B y la VL de P-CAD del sub-Dominio 2B forman un dominio de unión a VL/VH capaz de unirse específicamente a un epítopo de P-cadherina.

En otro aspecto, el sub-Dominio 1A comprende un dominio de unión a VH de un anticuerpo anti-P-cadherina (VH de P-CAD) o un anticuerpo anti-CD3 (VH de CD3), y el sub-Dominio 1B comprende un dominio de unión a VL de un anticuerpo anti-P-cadherina (VL de P-CAD), si el sub-Dominio 1A comprende VH de CD3, o un anticuerpo anti-CD3 (VL de CD3), si el sub-Dominio 1A comprende una VH de P-CAD; y en donde el sub-Dominio 2B comprende una VH de P-CAD o una VH de CD3 de acuerdo con el dominio VH seleccionado para el sub-Dominio 1A, y el sub-Dominio 2A comprende la VL de P-CAD, si el sub-Dominio 2B comprende una VH de CD3, o una VL de CD3, si el sub-Dominio 2B comprende una VH de P-CAD.

En un aspecto particular, el sub-Dominio 1A comprende una VH de P-CAD y el sub-Dominio 1B comprende una VL de CD3, y el sub-Dominio 2B comprende una VH de CD3 y el sub-Dominio 2A comprende una VL de P-CAD; y en donde la VH de P-CAD del sub-Dominio 1A y la VL de P-CAD del sub-Dominio 2A forman un dominio de unión a VL/VH capaz de unirse específicamente a un epítopo de P-cadherina, y la VL de CD3 del sub-Dominio 1B y la VH de CD3 del sub-Dominio 2B forman un dominio de unión a VL/VH capaz de unirse específicamente a un epítopo de CD3.

En un aspecto particular, el sub-Dominio 1A comprende una VH de CD3 y el sub-Dominio 1B comprende una VL de P-CAD, y el sub-Dominio 2B comprende una VH de P-CAD y el sub-Dominio 2A comprende una VL de CD3; y en donde la VH de CD3 del sub-Dominio 1A y la VL de CD3 del sub-Dominio 2A forman un dominio de unión a VL/VH capaz de unirse específicamente a un epítopo de CD3, y la VL de P-CAD del sub-Dominio 1B y la VH de P-CAD del sub-Dominio 2B forman un dominio de unión a VL/VH capaz de unirse específicamente a un epítopo de P-cadherina.

La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos en donde el primer dominio promotor del heterodímero y el segundo

dominio promotor del heterodímero comprenden una región Fc de IgG que comprende un dominio CH2 y un CH3, en donde la secuencia de aminoácidos del dominio CH2 y/o el dominio CH3 comprende al menos una modificación de aminoácidos, en comparación con una región Fc de IgG de tipo silvestre, para formar un botón o un ojal. En un aspecto, el primer dominio promotor del heterodímero y el segundo dominio promotor del heterodímero no son ambos botones o ambos ojales; y/o en donde el primer dominio promotor del heterodímero y el segundo dominio promotor del heterodímero forman una región Fc de la inmunoglobulina IgG. En otro aspecto, la región Fc de IgG que forma el botón comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 63, y la región Fc de IgG que forma el ojal comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 64.

La presente invención además proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, en donde el primer dominio promotor del heterodímero y el segundo dominio promotor del heterodímero comprenden una región de la espiral E que comprende ácido glutámico y una espiral alfa-helicoidal cargada negativamente o una región de la espiral K que comprende lisina y una espiral helicoidal cargada positivamente; y en donde el primer dominio promotor del heterodímero y el segundo dominio promotor del heterodímero no son regiones de la espiral E o regiones de la espiral Ks En un aspecto, la región de la espiral E comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 61, y/o la región de la espiral K comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 62.

La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, en donde el sub-Dominio 1A y el sub-Dominio 1B pueden estar ligados por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) y no se asocian para formar un dominio de unión al epítopo VL/VH, y el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A pueden estar ligados por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) y no se asocian para formar un dominio de unión al epítopo VL/VH. En un aspecto de la invención, el ligador de glicina-serina (Ligador 1) comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69.

La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, en donde el primer dominio promotor del heterodímero comprende un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 1B y/o el segundo dominio promotor del heterodímero comprende un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 2A. En un aspecto, el Ligador 2 del primer dominio promotor del heterodímero y/o el segundo dominio promotor del heterodímero además comprende al menos un residuo de glicina. En otro aspecto, el Ligador 2 del primer dominio promotor del heterodímero

y/o el segundo dominio promotor del heterodímero comprende una secuencia de GFNRGEC (SEQ ID NO: 70), GVEPKSC (SEQ ID NO: 71), GGCGGG (SEQ ID NO: 72), GCPPCP (SEQ ID NO: 73), GGTGGCPPCP (SEQ ID NO: 74), GEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 75) o GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 76). En otro aspecto, el Ligador 2 del primer dominio promotor del heterodímero comprende la secuencia de GCPPCP (SEQ ID NO: 73), GGTGGCPPCP (SEQ ID NO: 74), GEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 75) o GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 76), y el Ligador 2 del segundo dominio promotor del heterodímero comprende la secuencia de GCPPCP (SEQ ID NO: 73), GGTGGCPPCP (SEQ ID NO: 74), GEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 75) o GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 76). En otro aspecto, el Ligador 2 del primer dominio promotor del heterodímero comprende la secuencia de GGCGGG (SEQ ID NO: 72), y el Ligador 2 del segundo dominio promotor del heterodímero comprende la secuencia de GGCGGG (SEQ ID NO: 72). En otro aspecto, el Ligador 2 del primer dominio promotor del heterodímero comprende la secuencia de GFNRGEC (SEQ ID NO: 70) y el Ligador 2 del segundo dominio promotor del heterodímero comprende la secuencia de GVEPKSC (SEQ ID NO: 71), o el Ligador 2 del primer dominio promotor del heterodímero comprende la secuencia de GVEPKSC (SEQ ID NO: 71) y el Ligador 2 del segundo dominio promotor del heterodímero comprende la secuencia de GFNRGEC (SEQ ID NO: 70).

La presente invención proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, en donde los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos se unen específicamente al dominio extracelular 3 (ECD3) de la P-cadherina humana. La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, en donde el diacuerpo heterodimérico biespecífico se une específicamente a un epítopo en P-cadherina pero no se une a un epítopo en E-cadherina o VE-cadherina. La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, en donde los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos se unen específicamente a un epítopo en la P-cadherina humana pero no se unen a un epítopo en la P-cadherina de ratón.

La presente invención proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, en donde los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos demuestran una vida media sérica y tumoral extendida. El análisis farmacocinético se puede realizar mediante varios ensayos, tales como ELISA. La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, en donde los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos demuestran una EC50 inferior en presencia de niveles de expresión de

P-cadherina aumentados o niveles de densidad del receptor aumentados. La EC50 se puede determinar mediante varios ensayos de citotoxicidad in vitro e in vivo.

La presente invención proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, que comprende una CDR1 VL de P-CAD, una CDR2 VL de P-CAD, y una CDR3 VL de P-CAD de una VL de P-CAD que comprende una secuencia de la SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 ó 23; una CDR1 VH de CD3, una CDR2 VH de CD3, y una CDR3 VH de CD3 de una VH de CD3 que comprende una secuencia de la SEQ ID NOS: 45 ó 46; una CDR1 VL de CD3, una CDR2 VL de CD3, y una CDR3 VL de CD3 de una VL de CD3 que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 47; y/o una CDR1 VH de P-CAD, una CDR2 VH de P-CAD, y una CDR3 VH de P-CAD de una VH de P-CAD que comprende una secuencia de la SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ó 24.

La presente invención proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, que comprenden la CDR1 VL de P-CAD comprende una secuencia de la SEQ ID NOS: 35 o 36, la CDR2 VL de P-CAD comprende una secuencia de la SEQ ID NOS: 37 o 38, y la CDR3 VL de P-CAD comprende una secuencia de la SEQ ID NOS: 39, 40, 41, 42, 43 o 44; la CDR1 VH de CD3 comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 48, la CDR2 VH de CD3 comprende una secuencia de la SEQ ID NOS: 49 o 50, y la CDR3 VH de CD3 comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 51; la CDR1 VL de CD3 comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 55, la CDR2 VL de CD3 comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 56, y la CDR3 VL de CD3 comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 57; y/o la CDR1 VH de P-CAD comprende una secuencia de la SEQ ID NOS: 25 ó 33, la CDR2 VH de P-CAD comprende una secuencia de la SEQ ID NOS: 26 ó 34, y una CDR3 VH de P-CAD que comprende una secuencia de la SEQ ID NOS: 27, 28, 29, 30, 31 ó 32.

En un aspecto de la presente invención, la CDR1 VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35, la CDR2 VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 37, la CDR3 VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 41, la CDR1 VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25, la CDR2 VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26, y la CDR3 VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 28. En otro aspecto, la CDR1 VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35; la CDR2 VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 37; y la CDR3 VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 42, la CDR1 VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25, la CDR2 VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26, y la CDR3 VH de P-CAD comprende

la secuencia de SEQ ID NO: 29. En otro aspecto, la CDR1 VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35; la CDR2 VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 37, la CDR3 VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 43, la CDR1 VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25, la CDR2 VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26, y la CDR3 VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 30. En otro aspecto, la CDR1 VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35; la CDR2 VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 37, la CDR3 VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 39, la CDR1 VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25, la CDR2 VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26, y la CDR3 VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 31.

La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, que comprenden una VL de P-CAD que comprende una secuencia de la SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 ó 23; una VH de CD3 que comprende una secuencia de la SEQ ID NOS: 45 ó 46; una VL de CD3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 47; y una VH de P-CAD que comprende una secuencia de la SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ó 24. En un aspecto, la VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, y la VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6. En otro aspecto, la VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7, y la VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 y la VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10. En otro aspecto, la VL de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y la VH de P-CAD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16.

La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos capaces de unirse específicamente a un epítopo de P-cadherina y a un epítopo de CD3 que comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, en donde la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 90 y la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 91. La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos capaces de unirse específicamente a un epítopo de P-cadherina y a un epítopo de CD3 que comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, en donde la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 92 y la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 93.

La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos capaces de unirse específicamente a un epítopo de P-cadherina y a un epítopo de CD3 que comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, en donde la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 88 y la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 89.

La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos en donde la primera y segunda cadenas polipeptídicas se pueden unir de forma covalente entre sí mediante al menos un enlace disulfuro.

La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos capaces de unirse específicamente a un epítopo de P-cadherina y a un epítopo de CD3 que comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, en donde la primera cadena polipeptídica y segunda cadena polipeptídica comprende ñas secuencias expuestas en la Figura 30A, 30B, 31A, 31B, 32A o 32B. En otro aspecto de la invención, los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos comprenden una primera cadena polipeptídica, una segunda cadena polipeptídica y una tercera cadena polipeptídica expuesta en la Tabla 5.

La presente invención proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, en donde los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos se pueden conjugar a una marca detectable, que incluye pero sin limitación, fluoróforo o un radionúclido.

La presente invención proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos que se unen a P-cadherina y compiten por la unión a los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos descriptos en la presente.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un diacuerpo heterodimérico biespecífico descripto en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un método de tratar trastornos asociados con P-cadherina en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente un diacuerpo heterodimérico biespecífico descripto en la presente o una composición farmacéutica que comprende un diacuerpo heterodimérico biespecífico descripto en la presente. La presente invención también proporciona un método de tratar trastornos asociados con P-cadherina en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente el diacuerpo heterodimérico biespecífico descripto en la presente o una composición farmacéutica que comprende un diacuerpo heterodimérico biespecífico descripto en la presente, en donde se activa o induce una

respuestas de células T citolíticas.

La presente invención además proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos descriptos en la presente para usar en la terapia. La presente invención además proporciona el uso de diacuerpos heterodiméricos biespecíficos descriptos en la presente en la fabricación de un medicamento para usar en la terapia. En otro aspecto, la terapia es el tratamiento del trastorno asociado con P-cadherina. La presente invención además proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos descriptos en la presente para usar en la terapia, en donde la terapia activa o induce una respuestas de células T citolíticas.

En un aspecto, el trastorno asociado con P-cadherina es cáncer. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer que expresa P-cadherina o P cadherina positivo. Los cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, colorrectal, ovárico, gástrico, de tiroides, próstata, de cuello uterino, pancreático, pulmonar, de la vejiga, del hígado, endometrial, de cabeza y cuello, testicular y glioblastoma.

La presente invención además proporciona células huésped aisladas que producen de modo recombinante diacuerpos heterodiméricos biespecíficos descriptos en la presente, polinucleótidos aislados que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos descriptos en la presente, y vectores que comprende los polinucleótidos.

La presente invención además proporciona métodos de producir diacuerpos heterodiméricos biespecíficos descriptos en la presente, que comprende cultivar las células huésped descriptas en la presente en condiciones que generan la producción de los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos, y la purificación de los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos del sobrenadante del cultivo.

La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos descriptos en la presente, en donde una estructura cristalina se ensambla en una estructura esférica compacta estabilizada por una unión disulfuro entre un par de residuos de cisteína que consiste en un residuo de cisteína en la posición 239 (Cys^{239}) del sub-Dominio 1B y un residuo de cisteína en la posición 246 (Cys^{246}) del sub-Dominio 2A; y, en donde el cristal difracta rayos X para la determinación de las coordenadas atómicas para proporcionar la resolución mejor de aproximadamente 2,0 Angstroms.

La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos capaces de unirse específicamente a un epítopo de P-cadherina y a un epítopo de CD3 que comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda

cadena polipeptídica, en donde la primera cadena polipeptídica comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un Dominio 1, que comprende un sub-Dominio 1A que comprende un dominio de unión a VL de un anticuerpo anti-CD3 (VL de CD3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 47, y un sub-Dominio 1B que comprende un dominio de unión a VH de un anticuerpo anti-P-cadherina (VH de P-CAD) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 6, en donde el sub-Dominio 1A y el sub-Dominio 1B se puede unir de modo covalente mediante un ligador de glicina-serina (Ligador 1) y no se asocian para formar un dominio de unión al epítopo VL/VH; y la segunda cadena polipeptídica comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un Dominio 2, que comprende un sub-Dominio 2B que comprende una VL de P-CAD que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 5, y un sub-Dominio 2A que comprende una VH de CD3 que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 45, en donde el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A se pueden unir de modo covalente mediante un ligador de glicina-serina (Ligador 1) y no se asocian para formar un dominio de unión al epítopo VL/VH; y en donde estructura cristalina se ensambla en una estructura esférica compacta estabilizada por una unión disulfuro entre un par de residuos de cisteína que comprende un residuo de cisteína en la posición 239 (Cys^{239}) del sub-Dominio 1B y un residuo de cisteína en la posición 246 (Cys^{246}) del sub-Dominio 2A; y, en donde el cristal difracta rayos X para la determinación de las coordenadas atómicas para proporcionar la resolución mejor de aproximadamente 2,0 Angstroms.

En otro aspecto, los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos descriptos en la presente contienen dos sitios de unión al antígeno separados entre sí por aproximadamente 40 Angstroms y los sitios de unión se pueden ubicar en los lados opuestos ortogonales del diacuerpo heterodimérico biespecífico.

La presente invención además proporciona métodos de identificar ubicaciones adicionales para los residuos de cisteína para formar una unión disulfuro dentro de los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos sobre la base de las estructuras cristalinas descriptas en la presente, en donde la estructura cristalina se analiza para un par de ubicaciones del residuo de aminoácido por la sustitución con un par de residuos de cisteína que forman una unión disulfuro. En un aspecto particular de la presente invención, el par de ubicaciones del residuo de aminoácido para la sustitución con un par de residuos de cisteína que forman una unión disulfuro se pueden seleccionar del grupo que consiste en las ubicaciones de aminoácido Gln^{121}(VH1B)Gly^{160}(VL1A), Val^{129}(VH1B)Gly^{244}(VL1A), Val^{123}(VH1B)Gly^{160}(VL1A), Gly^{126}(VH1B)Ser^{242}(VL1A), y Ala^{127}(VH1B)Ser^{242}(VL1A). La unión disulfuro puede reducir la accesibilidad del

solvente y reducir la longitud de los ligadores.

La presente invención además proporciona métodos de manipular genéticamente las variantes del diacuerpo heterodimérico biespecífico en un intento de formar una asociación interdominio más estable, en donde la manipulación genética es a través de mutagénesis dirigida al sitio del aminoácido en la interfaz interdominio basada en la estructura cristalina descripta en la presente, en donde la mutagénesis dirigida al sitio de aminoácido llena los huecos/orificios interiores grandes. En un aspecto particular de la presente invención, la mutagénesis dirigida al sitio puede aumentar los volúmenes de la cadena lateral del aminoácido mediante el reemplazo de aminoácidos pequeños por aminoácidos con cadenas laterales aromáticas voluminosas. En otro aspecto de la invención, los aminoácidos pequeños se pueden seleccionar del grupo que consisten en aminoácidos de las posiciones Ala^{44}(VL1A), Val^{213}(VH2A), Leu^{238}(VH2A), o Met^{231}(VL2B). En otro aspecto de la invención, los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas voluminosas se pueden seleccionar del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina o triptófano.

La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen a P-cadherina, que comprenden un CDR1, una CDR2, y una CDR3 de una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de las SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 ó 23 y/o una CDR1, una CDR2, y una CDR3 de una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ó 24.

En otro aspecto de la invención, los anticuerpos descriptos en la presente comprenden una CDR1 de VL que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 35 o 36, una CDR2 de VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 37 o 38, una CDR3 de VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43 o 44, una CDR1 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25 ó 33, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 ó 34, y una CDR3 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31 ó 32.

En otro aspecto de la invención, los anticuerpos descriptos en la presente comprenden una CDR1 de VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35 o 36, a CDR2 de VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 37 o 38, una CDR3 de VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43 o 44, una CDR1 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26, y una CDR3 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31 ó 32.

En otro aspecto de la invención, los anticuerpos descriptos en la presente comprenden una CDR1 de VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35, una CDR2 de VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 37, una CDR3 de VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 42, una CDR1 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26, y una CDR3 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29.

La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen a P-cadherina, que comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23, y/o una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ó 24. En otro aspecto de la invención, los anticuerpos descriptos en la presente comprenden un aminoácido de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, y/o una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6. En otro aspecto de la invención, los anticuerpos descriptos en la presente comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7, y/o una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8. En otro aspecto de la invención, los anticuerpos descriptos en la presente comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 y/o una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10. En otro aspecto de la invención, los anticuerpos descriptos en la presente comprenden a región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y/o una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16.

La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen a P-cadherina y compiten por la unión a P-cadherina con los anticuerpos descriptos en la presente.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo descripto en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención además proporciona un método de tratar un trastorno asociado con P-cadherina en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente un anticuerpo descripto en la presente o a composición farmacéutica que comprende un anticuerpo descripto en la presente. La presente invención además proporciona anticuerpos descriptos en la presente para usar en la terapia. La presente

invención además proporciona el uso de anticuerpos descriptos en la presente en la fabricación de un medicamento para usar en la terapia.

En un aspecto, el trastorno asociado con P-cadherina es cáncer. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer que expresa P-cadherina o P cadherina positivo. Los cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, colorrectal, ovárico, gástrico, de tiroides, próstata, de cuello uterino, pancreático, pulmonar, de la vejiga, de hígado, endometrial, de cabeza y cuello, testicular y glioblastoma.

La presente invención además proporciona ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos descriptos en la presente. En otro aspecto de la invención, los ácidos nucleicos pueden comprender una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114 y 116. En un aspecto adicional de la invención, los ácidos nucleicos pueden comprender una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 y 115. La presente invención además proporciona vectores que comprenden ácidos nucleicos descriptos en la presente y células huésped que comprende los vectores descriptos en la presente.

La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos o anticuerpos descriptos en la presente, en donde la VL de P-CAD comprende una secuencia de la CDR1 VL de P-CAD que comprende $X_{L1.1}$-$X_{L1.2}$-$X_{L1.3}$-$X_{L1.4}$- $XL_{1.5}$- $X_{L1.6}$-$X_{L1.7}$-$X_{L1.8}$- $X_{L1.9}$-$X_{L1.10}$- $X_{L1.11}$-$X_{L1.2}$-$X_{L1.13}$, en donde $X_{L1.1}$ a $X_{L1.13}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 57, Tabla 58, o Tabla 59; una secuencia de CDR2 VL de P-CAD que comprende $X_{L2.1}$-$X_{L2.2}$-$X_{L2.3}$-$X_{L2.4}$-$X_{L2.5}$-$X_{L2.6}$- $X_{L2.7}$, en donde $X_{L2.1}$ a $X_{L2.7}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 60, Tabla 61, o Tabla 62; y una secuencia de CDR3 VL de P-CAD que comprende $X_{L3.1}$-$X_{L3.2}$-$X_{L3.3}$-$X_{L3.4}$-$X_{L3.5}$-$X_{L3.6}$- $X_{L3.7}$- $X_{L3.8}$-$X_{L3.9}$-$X_{L3.10}$- $X_{L3.11}$, en donde $X_{L3.1}$ a $X_{L3.11}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 63, Tabla 64, o Tabla 65; y la VH de P-CAD comprende: una secuencia de CDR1 VH de P-CAD que comprende $X_{H1.1}$-$X_{H1.2}$-$X_{H1.3}$-$X_{H1.4}$- $X_{H1.5}$-$X_{H1.6}$-$X_{H1.7}$-$X_{H1.8}$-$X_{H1.9}$-$X_{H1.10}$ o $X_{H1.5,}$ $X_{H1.6}$-$X_{H1.7}$-$X_{H1.8}$-$X_{H1.9}$- $X_{H1.10}$, en donde $X_{H1.1}$ a $X_{H1.10}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 48, Tabla 49, o Tabla 50; una secuencia de CDR2 VH de P-CAD que comprende $X_{H2.1}$-$X_{H2.2}$-$X_{H2.3}$-$X_{H2.4}$- $X_{H2.5}$-$X_{H2.6}$- $X_{H2.7}$-$X_{H2.8}$-$X_{H2.9}$-$X_{H2.10}$-$X_{H2.11}$-$X_{H2.12}$-$X_{H2.13}$-$X_{H2.14}$-$X_{H2.15}$-$X_{H2.16}$-$X_{H2.17}$ o $X_{H2.1}$-$X_{H2.2}$-$X_{H2.3}$-$X_{H2.4}$- $X_{H2.5}$-$X_{H2.6}$- $X_{H2.7}$-$X_{H2.8}$-$X_{H2.9}$-$X_{H2.10}$, en donde $X_{H2.1}$ a $X_{H2.17}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de

acuerdo con la columna 3 de la Tabla 51, Tabla 52, o Tabla 53; y una secuencia de CDR3 VH de P-CAD que comprende $X_{H3.1}$-$X_{H3.2}$-$X_{H3.3}$-$X_{H3.4}$- $X_{H3.5}$-$X_{H3.6}$- $X_{H3.7}$-$X_{H3.8}$-$X_{H3.9}$, en donde $X_{H3.1}$ a $X_{H3.9}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 54, Tabla 55, o Tabla 56.

En un aspecto, $X_{L1.1}$ a $X_{L1.13}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 57. En otro aspecto, $X_{L1.1}$ a $X_{L1.13}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 58. En otro aspecto, $X_{L1.1}$ a $X_{L1.13}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 59. En otro aspecto, $X_{L2.1}$ a $X_{L2.7}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 60. En otro aspecto, $X_{L2.1}$ a $X_{L2.7}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 61. En otro aspecto, $X_{L2.1}$ a $X_{L2.7}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de o la Tabla 62. En otro aspecto, $X_{L3.1}$ a $X_{L3.11}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 63. En otro aspecto, $X_{L3.1}$ a $X_{L3.11}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 64. En otro aspecto, $X_{L3.1}$ a $X_{L3.11}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 of o Tabla 65.

En otro aspecto, $X_{H1.1}$ a $X_{H1.10}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 48. En otro aspecto, $X_{H1.1}$ a $X_{H1.10}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 49. En otro aspecto, $X_{H1.1}$ a $X_{H1.10}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 50. En otro aspecto, $X_{H2.1}$ a $X_{H2.17}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 51. En otro aspecto, $X_{H2.1}$ a $X_{H2.17}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 52. En otro aspecto, $X_{H2.1}$ a $X_{H2.17}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 53. En otro aspecto, $X_{H3.1}$ a $X_{H3.9}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 54. En otro aspecto, $X_{H3.1}$ a $X_{H3.9}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 55. En otro aspecto, $X_{H3.1}$ a $X_{H3.9}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla

56.

La presente invención también proporciona diacuerpos heterodiméricos biespecíficos o anticuerpos descriptos en la presente, en donde la VL de P-CAD comprende una secuencia de la CDR1 VL de P-CAD que comprende $X_{L1.1}$-$X_{L1.2}$-$X_{L1.3}$-$X_{L1.4}$- $XL_{1.5}$- $X_{L1.6}$-$X_{L1.7}$-$X_{L1.8}$- $X_{L1.9}$-$X_{L1.10}$- $X_{L1.11}$-$X_{L1.2}$-$X_{L1.13}$, en donde $X_{L1.1}$ a $X_{L1.13}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 o columna 4 de la Tabla 69; una secuencia de CDR2 VL de P-CAD que comprende $X_{L2.1}$-$X_{L2.2}$-$X_{L2.3}$-$X_{L2.4}$-$X_{L2.5}$-$X_{L2.6}$- $X_{L2.7}$, en donde $X_{L2.1}$ a $X_{L2.7}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 o columna 4 de la Tabla 70; y una secuencia de CDR3 VL de P-CAD que comprende $X_{L3.1}$-$X_{L3.2}$-$X_{L3.3}$-$X_{L3.4}$-$X_{L3.5}$-$X_{L3.6}$- $X_{L3.7}$- $X_{L3.8}$-$X_{L3.9}$-$X_{L3.10}$- $X_{L3.11}$, en donde $X_{L3.1}$ a $X_{L3.11}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 o columna 4 de la Tabla 71; y la VH de P-CAD comprende una secuencia de CDR1 VH de P-CAD que comprende $X_{H1.1}$-$X_{H1.2}$-$X_{H1.3}$-$X_{H1.4}$- $X_{H1.5}$-$X_{H1.6}$- $X_{H1.7}$-$X_{H1.8}$-$X_{H1.9}$-$X_{H1.10}$ o $X_{H1.5,}$ $X_{H1.6}$-$X_{H1.7}$-$X_{H1.8}$-$X_{H1.9}$- $X_{H1.10}$, en donde $X_{H1.1}$ a $X_{H1.10}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 o columna 4 de la Tabla 66; una secuencia de CDR2 VH de P-CAD que comprende $X_{H2.1}$-$X_{H2.2}$-$X_{H2.3}$-$X_{H2.4}$- $X_{H2.5}$-$X_{H2.6}$- $X_{H2.7}$-$X_{H2.8}$-$X_{H2.9}$-$X_{H2.10}$-$X_{H2.11}$-$X_{H2.12}$-$X_{H2.13}$-$X_{H2.14}$-$X_{H2.15}$-$X_{H2.16}$-$X_{H2.17}$ o $X_{H2.1}$-$X_{H2.2}$-$X_{H2.3}$-$X_{H2.4}$- $X_{H2.5}$-$X_{H2.6}$- $X_{H2.7}$-$X_{H2.8}$-$X_{H2.9}$-$X_{H2.10}$, en donde $X_{H2.1}$ a $X_{H2.17}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 o columna 4 de la Tabla 67, y una secuencia de CDR3 VH de P-CAD que comprende $X_{H3.1}$-$X_{H3.2}$-$X_{H3.3}$-$X_{H3.4}$- $X_{H3.5}$-$X_{H3.6}$- $X_{H3.7}$-$X_{H3.8}$-$X_{H3.9}$, en donde $X_{H3.1}$ a $X_{H3.9}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 o columna 4 de la Tabla 68.

En un aspecto, $X_{L1.1}$ a $X_{L1.13}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 69. En otro aspecto, $X_{L1.1}$ a $X_{L1.13}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 4 de la Tabla 69. En otro aspecto, $X_{L2.1}$ a $X_{L2.7}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 70. En otro aspecto, $X_{L2.1}$ a $X_{L2.7}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 4 de la Tabla 70. En otro aspecto, $X_{L3.1}$ a $X_{L3.11}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 71. En otro aspecto, $X_{L3.1}$ a $X_{L3.11}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 4 de la Tabla 71. En otro aspecto, $X_{H1.1}$ a $X_{H1.10}$ cada uno de modo independiente es un residuo de

aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 66. En otro aspecto, $X_{H1.1}$ a $X_{H1.10}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 4 de la Tabla 66. En otro aspecto, $X_{H2.1}$ a $X_{H2.17}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 67. En otro aspecto, $X_{H2.1}$ a $X_{H2.17}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 4 de la Tabla 67. En otro aspecto, $X_{H3.1}$ a $X_{H3.9}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 3 de la Tabla 68. En otro aspecto, $X_{H3.1}$ a $X_{H3.9}$ cada uno de modo independiente es un residuo de aminoácido de acuerdo con la columna 4 de la Tabla 68.

Además, la presente invención proporciona $X_{H1.8}$ es G, $X_{H2.5}$ es Y, $X_{H3.1}$ es I, $X_{H3.7}$ es F, $X_{L3.3}$ es W, $X_{H2.6}$ es N, $X_{H2.16}$ es Q, $X_{H3.5}$ es N, $X_{H3.9}$ es I, $X_{L1.8}$ es G, $X_{L2.2}$ es N, $X_{L2.3}$ es N, $X_{L3.2}$ es T, y/o $X_{L3.4}$ es D. La presente invención también proporciona cualquier combinación de los aspectos descriptos en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A y 1B proporcionan esquemas de cuatro representaciones alternativas de diacuerpos heterodiméricos biespecíficos P-cadherina/CD3 LP-DART que tienen un primer dominio promotor del heterodímero y segundo dominio promotor del heterodímero que comprende una región Fc optimizada para asociar por medio de una asociación “botón en ojal”.

La Figura 2 proporciona una representación esquemática de un diacuerpo heterodimérico biespecífico VF-DART que dirige y activa simultáneamente las células T (por medio del antígeno CD3) y células tumorales (por medio del antígeno P-cadherina) que tiene una primera cadena polipeptídica (1) en donde un primer dominio promotor del heterodímero comprende un péptido C-terminal que forma un enlace disulfuro para la estabilidad con un péptido C-terminal de un segundo dominio promotor del heterodímero de una segunda cadena polipeptídica (2).

La Figura 3 proporciona una representación esquemática de un diacuerpo heterodimérico biespecífico VF-DART ensamblado que tiene una primera cadena polipeptídica (1) y segunda cadena polipeptídica (2) en donde un primer dominio promotor del heterodímero (tal como SEQ ID NO: 70 o SEQ ID NO: 71, descripto en detalle a continuación) y un segundo dominio promotor del heterodímero (tal como SEQ ID NO: 71 o SEQ ID NO: 70, de acuerdo con la selección del primer dominio promotor del heterodímero) comprende un residuo de cisteína.

La Figura 4 proporciona una representación esquemática de un diacuerpo

heterodimérico biespecífico EK-DART ensamblado que tiene una primera cadena polipeptídica (1) en donde un primer dominio promotor del heterodímero comprende una región rica en ácido glutámico que forma una espiral alfa helicoidal cargada negativamente (espiral E), y una segunda cadena polipeptídica (2) en donde un segundo dominio promotor del heterodímero comprende una región rica en lisina que forma una espiral helicoidal cargada positivamente (espiral K).

La Figura 5 proporciona una representación esquemática de un diacuerpo heterodimérico biespecífico LP-DART ensamblado que tiene un primer dominio promotor del heterodímero y un segundo dominio promotor del heterodímero que comprende una región Fc optimizada para asociar por medio de una asociación “botón en ojal”.

La Figura 6 proporciona las estructuras de un diacuerpo heterodimérico biespecífico alternativo que tiene un dominio de Fc denominado MP3-DART. El diacuerpo heterodimérico biespecífico se une al lado N-terminal del dominio de Fc y en consecuencia denominado “MP3-DART N-terminal”. El MP3-DART N-terminal comprende una primera, segunda y tercera cadena polipeptídica que se representan esquemáticamente. Se representa la estructura final del MP3-DART N-terminal.

La Figura 7 proporciona las estructuras de un diacuerpo heterodimérico biespecífico alternativo que tiene un dominio de Fc denominado MP3-DART. El diacuerpo heterodimérico biespecífico se une al lado C-terminal del dominio de Fc y en consecuencia se denomina “MP3 DART C-terminal”. El MP3 DART C-terminal comprende una primera, segunda y tercera cadena polipeptídica que se representan esquemáticamente. Se representa la estructura final del MP3 DART C-terminal.

La Figura 8 proporciona un análisis de regresión lineal que compara la actividad de los linfocitos T citotóxicos (CTL) con respecto a la expresión de P-cadherina de la superficie celular.

La Figura 9 demuestra la capacidad in vivo de 177 EK-DART para disminuir el volumen tumoral en el modelo de cáncer colorrectal HCT116 murino.

La Figura 10 demuestra la capacidad in vivo de 153 EK-DART para disminuir el volumen tumoral en el modelo de cáncer colorrectal HCT116 murino.

La Figura 11 demuestra la capacidad in vivo de 154 EK-DART para disminuir el volumen tumoral en el modelo de cáncer colorrectal HCT116 murino.

La Figura 12 demuestra la capacidad in vivo de 35 EK-DART para disminuir el volumen tumoral en el modelo de cáncer colorrectal HCT116 murino.

La Figura 13 demuestra la capacidad in vivo de 153 LP-DART para disminuir el

volumen tumoral en el modelo de cáncer colorrectal HCT116 murino.

La Figura 14 demuestra la capacidad in vivo de 153 LP-DART para disminuir el volumen tumoral en el modelo de cáncer colorrectal HCT116 murino.

Figura 15 demuestra la capacidad in vivo de 153 LP-DART para disminuir el volumen tumoral en el modelo de cáncer de próstata Du145 murino.

La Figura 16 demuestra la capacidad in vivo de 153 LP-DART para disminuir el volumen tumoral en el modelo de cáncer de pulmón H1650 murino.

Las Figuras 17A-17D demuestran la capacidad in vivo de 153 LP-DART para disminuir el volumen tumoral en un modelo de tumor establecido + células T humanas injertadas, 17E demuestra un análisis ANOVA de una vía del volumen tumoral.

Las Figuras 18A y 18B demuestran la capacidad in vivo de 153 LP-DART para disminuir el volumen tumoral en un modelo de transferencia adoptiva de células T humanas al tumor establecido.

La Figura 19 demuestra la capacidad in vivo de 153 LP-DART para disminuir el volumen tumoral en un xenoinjerto de tumor colorrectal derivado de paciente P-cadherina positivo.

La Figura 20 muestra un aumento dependiente de la dosis mediado por 153 LP-DART en los linfocitos infiltrantes de tumores (TILs).

Las Figuras 21A-21D proporcionan ensayos *in vitro* para evaluar las propiedades de 153 LP-DART y células T marcadas con fluoróforo.

Las Figuras 22A-22D proporcionan la biodistribución y direccionamiento de 153 LP-DART en un modelo de xenoinjerto H1650 usando imágenes FMT longitudinales.

Las Figuras 23A-23C muestran los datos farmacocinéticos (ELISA) del estudio de imágenes FMT.

La Figura 24A muestra la evaluación de la actividad de las células T de las células T marcadas con fluoróforo y sin marcar y 24B muestra la cinética del rastreo celular de las células T marcadas con fluoróforo en un modelo tumoral HCT116 usando imágenes FMT (in vivo).

La Figura 25 proporciona una representación esquemática de un constructo DART diseñado para cristalografía, que tiene una marca His C-terminal denominada “6XHIS” unido de modo covalente al dominio de VH de P-CAD y una FLAG C-terminal denominada “FLAG” unido de modo covalente al dominio del VH de CD3.

La Figura 26 proporciona una representación gráfica de la estructura cristalina de la cristalografía de la proteína 35 DART.

La Figura 27 proporciona una representación gráfica de la cristalografía de la

proteína 35 DART que muestra los sitios de unión al antígeno para las regiones anti-CDR CD3 y las regiones anti-CDR P-CAD.

La Figura 28 proporciona un esquema de una cristalografía de la variante de la proteína 35 DART con una asociación interdominio más estable a través de la mutagénesis dirigida al sitio en la interfaz del interdominio que contiene huecos/orificios interiores grandes que se pueden llenar con el aumento de los volúmenes de la cadena lateral con varios aminoácidos.

La Figura 29 proporciona una representación gráfica de la estructura cristalina de una cristalografía de la proteína 35 DART con varias ubicaciones del enlace disulfuro (Cys-Cys sites) para reducir la accesibilidad del solvente del enlace disulfuro, así como, reducir la longitud de los ligadores.

Las Figuras 30A y 30B proporcionan secuencias de aminoácidos para las primera y segunda cadenas polipeptídicas de los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos VF-DART de la presente invención.

Las Figuras 31A y 31B proporcionan secuencias de aminoácidos para la primera y segunda cadenas polipeptídicas de diacuerpos heterodiméricos biespecíficos EK-DART de la presente invención.

Las Figuras 32A y 32B proporcionan secuencias de aminoácidos para la primera y segunda cadenas polipeptídicas de diacuerpos heterodiméricos biespecíficos LP-DART de la presente invención.

La Figura 33 proporciona secuencias de aminoácidos para la primera y segunda cadenas polipeptídicas de DART diacuerpos heterodiméricos biespecíficos de la presente invención.

La Figura 34 proporciona constructos de la proteína de fusión del dominio extracelular (ECD) -Fc de P-cadherina para el mapeo de epítopos de P-cadherina 153 LP-DART .

La Figura 35 proporciona la secuencia del epítopo de P-cadherina de longitud completa (UniProt P22223, CADH3, Cadherina-3 humana).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención describe nuevos diacuerpos heterodiméricos biespecíficos que comprenden un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a P-cadherina, y un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CD3 para el reclutamiento y la activación de las células T citolíticas. Los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos pueden comprender además un dominio Fc. Además, se demuestra en la presente que los diacuerpos heterodiméricos

biespecíficos se dirigen y activan con éxito la citotoxicidad de células T en las células tumorales que expresan P-cadherina. Además, los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos de la presente invención han mejorado las propiedades farmacocinéticas para extender la vida media in vivo, y se diseñaron para acoplarse y activar las poblaciones de células T policlonales por medio del complejo CD3 en presencia de tumores que expresan P-cadherina.

La presente invención describe el aislamiento y la caracterización de los dominios de unión del anticuerpo de cadena simple completamente humanos contra P-cadherina derivada de las bibliotecas de despliegue en fagos humanos. La invención además proporciona la unión covalente de estos dominios de unión de P-cadherina a los dominios de unión al antígeno de los anticuerpos anti-CD3 en el formato DART descrito previamente (Moore et al, Blood, 117 (17): 4542-4551, 2011) para crear diacuerpos heterodiméricos biespecíficos que son capaces de unirse en forma simultánea a P-cadherina y CD3. Además, en un aspecto de la invención, las proteínas DART anti-P-cadherina/ anti-CD3, también conocidas como diacuerpos biespecíficos heterodiméricos, dirigen y activan con éxito la citotoxicidad de células T de células que expresan P-cadherina.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos de la técnica, notaciones y otros términos científicos o terminología usada en la presente tienen los significados comúnmente entendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en la presente para mayor claridad y/o para una pronta referencia, y la inclusión de tales definiciones en la presente no se debe interpretar necesariamente que representan una diferencia sustancial con respecto a lo que generalmente se entiende en la técnica. La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos, e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, tal como, Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1999, que incluye los suplementos hasta 2001); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, que incluye los suplementos hasta 2001); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001).

La P-cadherina (Cadherina-3, CDH3) pertenece a la superfamilia de cadherina clásica de glicoproteínas de transmembrana que regulan la adhesión célula-célula

dependiente de calcio durante el desarrollo y la homeostasis del tejido (Gumbiner et al, J. Cell Biol., 148: 399-403, (2000)). Los dominios intracelulares de cadherina interactúan directamente con cateninas citoplásmicas que se unen a la red del citoesqueleto de actina, lo que proporciona las bases moleculares de las interacciones celulares estables. El complejo cadherina/catenina, así como las vías de señalización controladas por esta estructura, representan un mecanismo regulador importante que guían las decisiones del destino celular, a través de su influencia sobre el crecimiento, diferenciación, motilidad y supervivencia celular (Cavallaro et al, 2011). Las cadherinas clásicas incluyen la E-cadherina (CDH1), N cadherina (CDH2) y P-cadherina (CDH3). La expresión de P-cadherina en tejidos normales es baja y está restringida principalmente a células mioepiteliales y las capas basales del epitelio estratificado. Se ha informado el aumento de la expresión de P-cadherina en varios tumores, que incluyen los cánceres mamarios, gástrico, endometrial, pancreático y colorrectal y es un buen pronosticador de mala supervivencia de los pacientes con enfermedad avanzada Hardy et al, 2002; Imai et al, 2008; Parades et al, 2005; Stefansson et al, 2004; Taniuchi et al, 2005). Los análisis del perfil de expresión génica y de inmunohistoquímica también sugirieron cáncer de pulmón (incluyendo, pero sin limitación, cánceres de pulmón de células no pequeñas y pulmón de células pequeñas), de ovario, cabeza y cuello, tiroides y vejiga.

CD3 (clúster de diferenciación 3) es un complejo de proteína del co-receptor de células T que comprende cuatro cadenas distintas ε, δ, γ y ζ que forman los dímeros εδ, εγ y ζζ.

Estos dímeros se asocian con una molécula conocida como el receptor de células T (TCR) y generan una señal de activación en los linfocitos T. Las moléculas de TCR y CD3 juntas comprenden el complejo TCR. Es bien conocido que los anticuerpos anti-CD3 provocan la generación de células T citotóxicas a través de la activación de la producción de linfoquinas endógenas y son capaces de eliminar selectivamente blancos tumorales (Yun et al, Cancer Research, 49:. 4770 a 4774 (1989)).

Más específicamente, las células T expresan complejos de TCR que son capaces de inducir respuestas inmunes específicas de antígeno (Smith Garvin et al, 2009). Los antígenos son péptidos expresados por las células tumorales y células infectadas por virus capaces de estimular las respuestas inmunitarias. Los antígenos expresados en forma intracelular se unen a las moléculas de histocompatibilidad de clase I mayor (MHC clase I) moléculas y se transportan a la superficie donde están

expuestos a las células T. Si la afinidad de unión del TCR al MHC de clase I en el complejo con el antígeno es suficiente se iniciará la formación de una sinapsis inmune. La señalización a través de la sinapsis inmune está mediada a través de los co-receptores CD3 que forman los dímeros de εδ, εγ y ζζ. Estos dímeros se asocian con el TCR y generan una señal de activación de los linfocitos T. Esta cascada de señalización dirige la destrucción mediada por las células T de la célula que expresa el antígeno. La citotoxicidad está mediada por la liberación y transferencia de granzima B y perforina de la célula T a la célula blanco.

Sin estar ligado por la teoría, se cree que los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos de la presente invención pueden permitir a las células T eludir la necesidad de la interacción de TCR y MHC clase I en el complejo con el antígeno, y en cambio redirecciona las células T a las células blanco a través de co-participación directa de CD3 (tales como CD3 epsilon) expresada en la célula T y P-cadherina expresada en el tumor.

"Función efectora" como se usa en la presente se entiende como la capacidad de soportar un evento bioquímico que resulta de la interacción de un dominio de unión anti-CD3 de un diacuerpo heterodimérico biespecífico con una célula T citotóxica.

Como se usa en la presente, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, Fv de cadena simple (scFv), anticuerpos de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos F (ab'), Fv biespecíficas unidas a disulfuro (sdFv), intracuerpos, y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id para los anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión al epítopo o dominios de unión de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2) o subclase.

Como se usa en la presente, el término "diacuerpo heterodimérico biespecífico" se refiere a un complejo de dos o más cadenas polipeptídicas o proteínas, cada una que comprende al menos un dominio de VL del anticuerpo y uno de VH del anticuerpo o fragmento de estos, en donde ambos dominios de unión del anticuerpo están comprendidos dentro de una cadena polipeptídica simple y en donde los dominios VL

y VH de cada cadena polipeptídica son de diferentes anticuerpos.

Como se usa en la presente, los términos "se une inmunoespecíficamente", "reconoce inmunoespecíficamente", "se une específicamente", "reconoce específicamente" y términos análogos se refieren a moléculas por ejemplo, dominios de unión, que se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, epítopo o complejo inmune) y no se unen específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad según se determina mediante ensayos conocidos en la técnica, por ejemplo inmunoensayos, BIAcore®, u otros ensayos. Con preferencia, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no reaccionan en forma cruzada con otras proteínas.

Como se usa en la presente, los términos "cadena pesada", "cadenas liviana", "región variable" o "dominio variable", "región estructural", "dominio constante", y similares, tienen su significado habitual en la técnica inmunológica y se refieren a dominios de inmunoglobulinas naturales y los dominios correspondientes de las proteínas de unión recombinantes (por ejemplo, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos quiméricos, etc.). La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas naturales es un tetrámero que tiene dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas, usualmente expresadas como una glicoproteína de aproximadamente 150.000 Da.

La porción amino-terminal (N-terminal) de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal (C-terminal) de cada cadena define una región constante. Cada cadena liviana está compuesta por un dominio variable de la cadena liviana (VL) y un dominio constante de la cadena liviana (CL). Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de la cadena pesada (VH) y una región constante de la cadena pesada, que tiene los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3. Las regiones variables de una molécula de IgG comprenden regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), que contienen los residuos en contacto con el antígeno, y segmentos no CDR, denominados regiones estructurales (FR), que generalmente mantienen la estructura y determinan la ubicación de los bucles de la CDR (aunque ciertos restos estructurales también se pueden poner en contacto con el antígeno). Cada VH y VL comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal a carboxi-terminal en la siguiente estructura: n-FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3,

CDR3, FR4-c. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) y clase (por ejemplo, IgGl, IgG2, IgG 3, IgG4, IgAl e IgA2) o subclase.

La "región bisagra" o "dominio bisagra" se define generalmente como que se extiende desde Glu216 a Pro230 de IgG-1 humana. Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 mediante la colocación del primer y último residuos de cisteína que forman la cadena pesada inter-S-S que se une en las mismas posiciones.

Como se usa en la presente, el término "región Fc", "dominio Fc" o términos análogos se utilizan para definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde los aminoácidos 231 al aminoácido 341 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde los aminoácidos 342 a 447 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana (también referido como dominio "Cγ 2") es único ya que no está estrechamente apareado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas a N se interponen entre los dos dominios CH2 de una IgG nativa intacta.

Cuando se refiere a las proteínas de unión, los dominios de unión, o anticuerpos (como se define en términos generales en la presente), la asignación de los aminoácidos a cada dominio se realiza de acuerdo con las definiciones del Kabat, Chothia, la acumulación de definiciones de Kabat y Chothia, AbM, contacto, y/o conformacional o cualquier método de la determinación de la CDR bien conocidos en la técnica. Las CDR del anticuerpo se pueden identificar como las regiones hipervariables originalmente definidas por Kabat et al. Ver, por ejemplo, Kabat et al., 1992, Secuencias of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Las posiciones de las CDR también se pueden identificar como el bucle estructural originalmente descripto por Chothia y otros. Ver, por ejemplo, Chothia et al., 1989, Nature 342:877-883. Otros abordajes a la identificación de CDR incluyen la “definición de AbM” que es un compromiso entre Kabat y Chothia y se deriva usando el programa de computación de modelado del anticuerpo Abm de Oxford Molecular (Accelrys, San Diego, CA), o la “definición de contacto” de las CDR basadas en los contactos de antígeno observados, expuestos en MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745. En otro método, denominado en la presente como

“definición de conformación” de las CDR, las posiciones de las CDR se pueden definir como los residuos que realizar contribuciones entálpicas a la unión del antígeno. Ver, por ejemplo, Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. Aún otras definiciones de límite de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los métodos anteriores, pero no obstante se pueden superponer con al menos una porción de las CDR de Kabat, si bien estas se pueden acortar o prolongar a la luz de la predicción o hallazgos experimentales de que los residuos o grupos de residuos particulares o incluso CDR completas no impactan significativamente en la unión del antígeno. Como se usa en la presente, una CDR se puede referir a las CDR definidas por cualquier método conocido en la técnica, que incluyen las combinaciones de métodos. Los métodos usados en la presente pueden utilizar las CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos abordajes. Para cualquier aspecto determinado que contiene más de una CDR, las CDR se pueden definir de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, extendida, AbM, contacto, y/o conformacional.

Un anticuerpo humanizado se refiere a las formas de anticuerpo no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina quiméricas o fragmentos de estas tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de unión o dominios de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen mínimas secuencias derivadas de inmunoglobulina no humana. Con preferencia, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor están reemplazados por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador) tal como ratón, rata o conejo que tiene especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un solo clon, que incluye por ejemplo, cualquier clon eucariótico, procariótico o fago, y no el método por el que se produce. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales a partir de los dominios de unión de los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos de la invención usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo el uso de las tecnología de hibridoma, recombinante, y despliegue en fago, o una combinación de estas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma incluyendo las conocidas en la técnica.

Los anticuerpos también se pueden generar usando diversos métodos de despliegue en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de despliegue en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se presentan en la superficie de las partículas

de fagos que llevan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En un aspecto particular, tal fago se puede usar para mostrar dominios de unión de antígeno, tales como Fab y Fv o Fv estabilizada por el enlace disulfuro, expresadas a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humanos o murinos). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos, que incluyen fd y M13. Los dominios de unión al antígeno se expresan como una proteína fusionada de modo recombinante a la proteína del gen III o VIII del fago. Los ejemplos de los métodos de despliegue en fagos que se pueden usar para preparar inmunoglobulinas, o fragmentos de estos, de la presente invención incluyen los descritos en Brinkmann et al. (1995) "Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragments," J. Immunol. Methods, 182:41-50.

Las características funcionales de los múltiples isotipos de IgG, y dominios de estos, son bien conocidos en la técnica. Las secuencias de aminoácidos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 son conocidas en la técnica. La selección y/o combinaciones de dos o más dominios de isotipos de IgG específicos para usar en los métodos de la invención se pueden basar en cualquier parámetro conocido de los isotipos precursores que incluyen afinidad a FcγR. Por ejemplo, el uso de regiones o dominios de los isotipos IgG que presentan unión limitada o ausente a FcγRIIB, por ejemplo, IgG2 o IgG4, pueden encontrar uso particular cuando se desea un diacuerpo heterodimérico biespecífico para manipular genéticamente para maximizar la unión a un receptor de activación y minimizar la unión a un receptor inhibidor. Del mismo modo, el uso de regiones o dominios de Fc de los isotipos de IgG conocidos para unir con preferencia C1q o FcγRIIIA, por ejemplo, se puede combinar IgG3 con modificaciones de aminoácidos de Fc conocidas en la técnica para mejorar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), para manipular genéticamente una molécula de diacuerpo heterodimérico biespecífico de modo que se maximiza la actividad de función efectora, por ejemplo, la activación del complemento o ADCC. En una manera similar, se pueden realizar las mutaciones en las regiones o dominios de Fc de isotipos de IgG que minimizan o eliminan la función efectora de la región Fc.

El término "epítopo" se refiere a la porción de una molécula capaz de ser reconocida por y unida por un anticuerpo en una o más de las regiones de unión al

antígeno del anticuerpo. Los epítopos a menudo consisten en un grupo de superficie químicamente activo de moléculas tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcares y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. El término “epítopo antigénico" como se usa en la presente, se define una porción de un polipéptido al que un anticuerpo se puede unir específicamente determinado por cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, por inmunoensayos convencionales. Un "epítopo no lineal" o "epítopo conformacional" comprende polipéptidos no contiguos (o aminoácidos) dentro de la proteína antigénica a la que se une un anticuerpo específico para el epítopo. Una vez que se determina un epítopo deseado en un antígeno, es posible generar anticuerpos frente a ese epítopo, por ejemplo, usando las técnicas descriptas en la presente. Durante el proceso de descubrimiento, la generación y caracterización de anticuerpos pueden dilucidar la información acerca de epítopos deseables. A partir de esta información, entonces es posible detectar analizar competitivamente anticuerpos para la unión al mismo epítopo. Un enfoque para lograrlo esto es llevar a cabo estudios de competición y competición cruzada para encontrar anticuerpos que compiten o compiten en forma cruzada entre sí por ejemplo los anticuerpos compiten por la unión al antígeno.

Un método es identificar el epítopo al que se unen los anticuerpos, o "mapeo de epítopos". Hay muchos métodos conocidos en la técnica para el mapeo y que caracterizan la localización de los epítopos en las proteínas, incluyendo la resolución de la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmento de gen, y ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 11 de Harlow y Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. En un ejemplo adicional, el mapeo de epítopos se puede usar para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo. El mapeo de epítopos está disponible comercialmente a partir de diversas fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Bajos). En un ejemplo adicional, se puede realizar la mutagénesis de un dominio de unión a antígeno, experimentos de intercambio de dominios y mutagénesis de barrido de alanina para identificar los residuos requeridos, suficientes, y/o necesarios para la unión al epítopo. La afinidad de unión y la tasa de disociación de una interacción de dominio de unión a antígeno se pueden determinar mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la

incubación de antígeno marcado, y la detección de la molécula unido al antígeno marcado. La afinidad de la molécula de la presente invención para un antígeno y las tasas de disociación se pueden determinar a partir de los datos de saturación por el análisis de Scatchard.

Las afinidades y las propiedades de unión de las moléculas de la invención de unión para un antígeno se pueden determinar inicialmente utilizando ensayos in vitro (ensayos basados bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para el dominio de unión al antígeno, que incluyen pero sin limitación ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA), ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR), ensayos de interferometría de biocapa o inmunoprecipitación. Las moléculas de la invención pueden tener propiedades de unión similares en los modelos *in vivo* (tales como los descritos y revelados en la presente) como los de los ensayos basados in vitro. Sin embargo, la presente invención no excluye moléculas de la invención que no presentan el fenotipo deseado en ensayos in vitro pero no exhiben el fenotipo deseado *in vivo*.

El término "afinidad de unión (K_D)" como se usa en la presente, se refiere a la tasa de disociación de una interacción de antígeno-anticuerpo particular. La K_D es la relación de la tasa de disociación, también llamada "constante de disociación (k_{off})", a la tasa de asociación, o "constante de asociación (k_{on})". En consecuencia, K_D equivale a k_{off}/k_{on} y se expresa como una concentración molar (M). De esto se deduce que a menor K_D, más fuerte es la afinidad de unión. En consecuencia, una K_D de 1 μM indica afinidad de unión débil en comparación con una K_D de 1 nM. Los valores de K_D para los anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar la K_D de un anticuerpo es por el uso de resonancia del plasmón superficial, normalmente mediante un sistema biosensor tal como un sistema Biacore. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y disociación de un antígeno a partir de chips con moléculas inmovilizadas (por ejemplo, moléculas que comprenden dominios de unión al epítopo), en su superficie. Otro método para determinar la K_D de un anticuerpo es mediante el uso de Interferometría Bio-Capa, típicamente usando la tecnología OCTET® (sistema Octet QK^E, ForteBio).

Como se usa en la presente, los términos "ácidos nucleicos" y "secuencias de nucleótidos" incluyen moléculas de ADN (por ejemplo ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas de ADN/ARN híbridos, y análogos de moléculas de ADN o ARN. Tales análogos se pueden generar usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que

incluyen, pero sin limitación, inosina o bases tritiladas. Tales análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden esqueletos modificados que se prestan atributos beneficiosos a las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a las nucleasas o un aumento de capacidad para atravesar las membranas celulares. Las secuencias de ácidos nucleicos o nucleótidos pueden ser de cadena simple, cadena doble, puede contener ambas porciones de cadena simple y cadena doble, y pueden contener porciones de cadena triple, pero con preferencia es ADN de cadena doble.

La presente invención también incluye polinucleótidos que codifican los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos de la invención, que incluyen los polipéptidos y regiones de unión de los anticuerpos. Se puede obtener polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinados, por cualquier método conocido en la técnica.

Los polinucleótidos que codifican los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos de la presente invención pueden incluir lo siguiente: solo la secuencia codificadora para la variante, la secuencia codificadora para la variante y secuencia codificadora adicional tales como un polipéptido funcional, o una secuencia señal o secretora o una secuencia de proproteína; la secuencia codificadora para el anticuerpo y secuencia no codificadora, tales como intrones o la secuencia no codificadora 5' y/o 3' de la secuencia codificadora para el anticuerpo. La expresión "polinucleótido que codifica un diacuerpo heterodimérico biespecífico" abarca un polinucleótido que incluye la secuencia codificadora adicional para la variante pero también un polinucleótido que incluye la secuencia codificadora y/o no codificadora adicional. Es conocido en la técnica que se puede obtener fácilmente una secuencia de polinucleótidos que está optimizada para una célula huésped/ sistema de expresión específica de la secuencia de aminoácidos de la proteína deseada (ver GENEART® AG, Regensburg, Alemania).

Como se usa en la presente, el término "cáncer" se refiere a una neoplasia o tumor resultante de un crecimiento descontrolado anormal de las células. En algunos aspectos, el cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizada. En otros aspectos, el cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras vecinas del cuerpo y se ha propagado a sitios distantes. En algunos aspectos, el cáncer se asocia con un antígeno de cáncer específico.

Como se usa en la presente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o manejar una enfermedad o trastorno. Una cantidad terapéuticamente efectiva se puede referir a la

cantidad de agente terapéutico suficiente para retardar o minimizar la aparición de la enfermedad, por ejemplo, retrasar o minimizar la propagación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente efectiva también se puede referir a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente efectiva con respecto a un agente terapéutico de la invención significa la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una enfermedad.

Como se usa en la presente, los términos "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier agente que se puede usar en la prevención de un trastorno, o la prevención de la recurrencia o propagación de un trastorno. Una cantidad profilácticamente efectiva puede referirse a la cantidad de agente profiláctico suficiente para prevenir la recurrencia o propagación de la enfermedad hiperproliferativa, particularmente cáncer, o la aparición de esta en un paciente, que incluye pero sin limitación a los predispuestos a la enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo los predispuestos genéticamente al cáncer o previamente expuestos a agentes carcinógenos. Una cantidad profilácticamente efectiva también se puede referir a la cantidad de agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad. Además, una cantidad profilácticamente efectiva con respecto a un agente profiláctico de la invención significa la cantidad de agente profiláctico solo, o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad.

Como se usa en la presente, los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la prevención de la recurrencia o la aparición de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto como resultado de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Como se usa en la presente, el término "en combinación" se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico. El uso de la expresión "en combinación" no restringe el orden en el que los agentes profilácticos y/o terapéuticos se administran a un sujeto con un trastorno. En otras palabras, la terapia de combinación se puede hacer por tratamiento en forma separada, secuencial o simultánea con los agentes terapéuticos.

Expresión recombinante de la moléculas de la invención

Una vez se ha obtenido una secuencia de ácidos nucleicos que codifica

moléculas de la invención (es decir, dominios de unión), se puede producir el vector para la producción de las moléculas por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la materia.

Los polinucleótidos que codifican los dominios de unión al diacuerpo heterodimérico biespecífico de la presente invención pueden incluir una secuencia de polinucleótidos de control de expresión unida operativamente a las secuencias codificadoras del anticuerpo, que incluye regiones promotoras asociadas naturalmente o heterólogas conocidas en la técnica. Las secuencias de control de la expresión pueden ser sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucarióticas, pero también se pueden usar secuencias control para los huéspedes procarióticos. Una vez que el vector se ha incorporado en la línea de células huésped apropiada, la célula huésped se propaga en condiciones adecuadas para expresar las secuencias de nucleótidos, y, según se desee, para la recolección y purificación de los anticuerpos. Las líneas celulares eucarióticas preferidas incluyen las líneas celulares CHO, varias líneas celulares COS, células HeLa, líneas celulares de mieloma, células B transformadas, o líneas celulares renales embrionarias humanas.

Diacuerpos heterodiméricos biespecíficos

Como se indicó previamente, el diacuerpo heterodimérico biespecífico se refiere a un complejo de dos o más cadenas polipeptídicas o proteínas, cada uno que comprende al menos un dominio VL del anticuerpo y un dominio VH del anticuerpo o fragmentos de estos, en donde ambos dominios de unión del anticuerpo están comprendidos dentro de una cadena polipeptídica simple y en donde los dominios VL y VH de cada cadena polipeptídica son de diferentes anticuerpos. En aspectos específicos, el diacuerpo heterodimérico biespecífico incluye dímeros o tetrámeros de cadenas polipeptídicas que contienen tanto el dominio VL como VH. Las cadenas polipeptídicas individuales que comprenden las proteínas multiméricas se pueden unir de modo covalente a al menos otro péptido del multímero por enlaces disulfuro intercatenarios.

Los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos de la presente invención se componen de dominios de unión a anti-P-cadherina (P-CAD) unidos covalentemente a dominios de unión a anti-CD3 (CD3) que utilizan una tecnología de la plataforma Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) (Publicaciones de solicitud de patente US. N.º 2007/0004909, 2009/0060910 y 2010/0174053). La tecnología DART proporciona una

unión covalente que produce una molécula que puede tener una estabilidad superior, apareamiento de cadena pesada y liviana y reconocimiento de antígeno óptimos. Además, el tamaño y contenido mínimo del ligador pueden disminuir el potencial de inmunogenicidad. Las proteínas de DART de la presente invención se dirigen simultáneamente las células T (CD3) y células tumorales (P-CAD) y dirigen y activan con éxito la citotoxicidad de células T a las células tumorales que expresan P-cadherina.

Cada cadena polipeptídica del diacuerpo heterodimérico biespecífico comprende un dominio VL y un dominio VH, que se puede unir covalentemente (Ligador 1) de modo que se restringe el autoensamblaje de los dominios de unión del anticuerpo. Además, cada cadena polipeptídica comprende un dominio de heterodimerización, que promueve la heterodimerización de las múltiples cadenas polipeptídicas y reduce la probabilidad de homodimerización de las diferentes cadenas polipeptídicas. El dominio de heterodimerización se puede ubicar en el extremo N-terminal o C-terminal de la cadena polipeptídica. El dominio de heterodimerización puede comprender un ligador de cisteína (Ligador 2) que es 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más de residuos de aminoácidos de longitud. La interacción de dos de las cadenas polipeptídicas puede producir dos apareamientos VL/VH, que forman dos dominios de unión al epítopo, es decir, molécula bivalente. Ni el dominio VH ni VL está restringido en ninguna posición dentro de la cadena polipeptídica, es decir, restringido al extremo amino o carboxi, ni los dominios están restringidos en sus posiciones relativas entre sí, es decir, el dominio VL puede ser N-terminal al dominio VH y viceversa. La única restricción es que puede estar disponible una cadena polipeptídica complementaria a fin de formar un diacuerpo funcional. Cuando los dominios VL y VH se derivan de los anticuerpos específicos para diferentes antígenos, la formación de un diacuerpo heterodimérico biespecífico funcional requiere la interacción de dos cadenas polipeptídicas diferentes, es decir, la formación de un heterodímero. En contraste, cuando dos cadenas polipeptídicas diferentes están libres para interactuar, por ejemplo, en un sistema de expresión recombinante, una que comprende VLA y VHB (A, que es un primer epítopo y B, es un segundo epítopo) y el otro que comprende una VLB y una VHA, se puede formar dos sitios de unión diferentes: VLA-VHA y VLB-VHB. Para todos los pares de cadenas polipeptídicas del diacuerpo heterodimérico biespecífico, el error de alineamiento o error de unión de las dos cadenas es una posibilidad, por ejemplo, la interacción de los dominios VL-VL o VH-VH. Sin embargo, la purificación de diacuerpos biespecíficos heterodiméricos funcionales se manejan

fácilmente de acuerdo con la inmunoespecificidad del sitio de unión dimerizado apropiadamente usando cualquier método basado en afinidad conocido en la técnica o ejemplificado en la presente, por ejemplo, cromatografía de afinidad.

Los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos de la invención pueden unirse simultáneamente a dos epítopos separados y distintos. En ciertos aspectos, al menos un sitio de unión al epítopo es específico para el determinante CD3 expresado en una célula efectora inmune por ejemplo, expresado en linfocitos T. En un aspecto, la molécula de diacuerpo heterodimérico biespecífico se une al determinante de las células efectoras y también activa la célula efectora. En un aspecto, el dominio de unión al epítopo es capaz de unirse al antígeno asociado a tumor P-cadherina que se asocia con cáncer de mama, colorrectal, ovárico, gástrico, de tiroides, próstata, del cuello uterino, pancreático, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de pulmón de células no pequeñas y pulmón de células pequeñas), de la vejiga, del hígado, endometrial, de cabeza y cuello, testicular y glioblastoma.

Los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos de la presente invención comprenden dominios de unión al antígeno derivados generalmente de las inmunoglobulinas o anticuerpos. Los anticuerpos de los cuales se derivan los dominios de unión usado en los métodos de la invención pueden ser de origen animal que incluye pájaros mamíferos Y (por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, murinos, burros, ovejas, conejos, cabras, cerdos de guinea, camellos, caballos, o pollo). Con preferencia, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Como se usa en la presente, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o bibliotecas de secuencias codificadoras de inmunoglobulina humana o de ratones que expresan anticuerpos de los genes humanos.

Los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos de la presente invención se pueden caracterizar en una variedad de maneras. En particular, las moléculas de la invención se pueden analizaron para determinar la capacidad de unirse inmunoespecíficamente a un antígeno. Las moléculas que se han identificado para unirse inmunoespecíficamente a un antígeno luego se pueden analizar para determinar su especificidad y afinidad por el antígeno.

Los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos de la presente invención se pueden producir usando una variedad de métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo la síntesis de novo de proteínas y la expresión recombinante de ácidos

nucleicos que codifican las proteínas de unión. Las secuencias de ácido nucleico deseadas se pueden producir por métodos recombinantes (por ejemplo, mutagénesis por PCR de una variante preparada anteriormente del polinucleótido deseado) o por síntesis de ADN en fase sólida. Por lo general, se utilizan métodos de expresión recombinantes. En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una VH y/o VL anti-CD3; en otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una VH y/o VL anti-P-cadherina. Debido a la degeneración del código genético, una variedad de secuencias de ácidos nucleicos codifica cada secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina, y la presente invención incluye todos los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión descriptas en la presente.

Ligadores/Péptidos

Las cadenas polipeptídicas de los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos pueden comprender varios ligadores y péptidos. Los ligadores y péptidos pueden tener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más aminoácidos. En ciertos aspectos, las cadenas polipeptídicas de los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos pueden comprender un ligador de glicina-serina (Ligador 1). En otro aspecto el Ligador 1 puede comprender, pero sin limitación, las secuencias de GGGSGGGG (SEQ ID NO: 68) y GGGGSGGGG (SEQ ID NO 69).

En ciertos aspectos, las cadenas polipeptídicas de los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos pueden comprender un ligador de cisteína (Ligador 2). En otro aspecto, el Ligador 2 también puede comprender al menos un residuo de glicina. En un aspecto, el Ligador 2 puede comprender, pero sin limitación, las secuencias seleccionadas de GFNRGEC (SEQ ID NO: 70), GVEPKSC (SEQ ID NO: 71), y GGCGGG (SEQ ID NO: 72). En ciertos aspectos, el Ligador 2 puede comprender una región bisagra de IgG1 truncada que tiene la secuencia CPPCP (SEQ ID NO 60) y al menos un residuo de glicina. En otro aspecto, el Ligador 2 puede comprender, pero sin limitación, las secuencias de GCPPCP (SEQ ID NO: 73), GGTGGCPPCP (SEQ ID NO: 74), GEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 75) y GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 76).

En ciertos aspectos, las cadenas polipeptídicas de los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos pueden comprender un Ligador 3. En un aspecto, el Ligador 3 puede comprender, pero sin limitación, la secuencia de KAPSSSPME (SEQ ID NO 77).

En ciertos aspectos, las cadenas polipeptídicas de los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos puede comprender a Péptido 1. En ciertos aspectos, el Péptido 1 puede comprender una región bisagra de IgG1 truncada que tiene la secuencia CPPCP (SEQ ID NO 60). En un aspecto, el Péptido 1 puede comprender, pero sin limitación, la secuencia de DKTHTCPPCP (SEQ ID NO 96).

VF-DART

En un aspecto de la presente invención, un diacuerpo heterodimérico biespecífico, conocido como un VF-DART, que se muestra en las Figuras 2 y 3, comprende una primera cadena polipeptídica (1) y una segunda cadena polipeptídica (2).

En un aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una región de unión a VL de un anticuerpo anti-P-cadherina (VL de P-CAD) o un anticuerpo anti-CD3 (VL de CD3), (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una región de unión a VH de un anticuerpo anti-P-cadherina (VH de P-CAD), si tal sub-Dominio 1A comprende una VL de CD3, o un anticuerpo anti-CD3 (VH de CD3), si el sub-Dominio 1A comprende una VL de P-CAD, y el sub-Dominio 1A y el sub-Dominio 1B pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 1B y el sub-Dominio 1A no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo; y pueden comprender un primer dominio promotor del heterodímero que comprende un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 1B.

En otro aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VH de P-CAD o una VH de CD3, (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VL de P-CAD, si el sub-Dominio 1A comprende una VH de CD3, o una VL de CD3, si el sub-Dominio 1A comprende una VH de P-CAD, el sub-Dominio 1A y sub-Dominio 1B pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 1B y el sub-Dominio 1A no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo; y pueden comprender un primer dominio promotor del heterodímero que comprende un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 1B.

En un aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VL de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VH de CD3. En otro aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-

Dominio 1A que comprende una VL de CD3 y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VH de P-CAD. En un aspecto adicional, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VH de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VL de CD3. En otro aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VH de CD3 y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VL de P-CAD.

En un aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B, que comprende una región de unión a VL de un anticuerpo anti-P-cadherina (VL de P-CAD) o un anticuerpo anti-CD3 (VL de CD3) de acuerdo con el dominio de VL seleccionado para el sub-Dominio 1A, (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una región de unión a VH de un anticuerpo anti-P-cadherina (VH de P-CAD), si tal sub-Dominio 2B comprende una VL de CD3, o un anticuerpo anti-CD3 (VH de CD3), si tal sub-Dominio 2B comprende una VL de P-CAD, y el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo; y pueden comprender un segundo dominio promotor del heterodímero que comprende un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 2A.

En otro aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VH de P-CAD o una VH de CD3, (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VL de P-CAD, si tal sub-Dominio 2B comprende una VH de CD3, o una VL de CD3, si tal sub-Dominio 2B comprende una VH de P-CAD, y el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo; y pueden comprender un segundo dominio promotor del heterodímero que comprende un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 2A.

En un aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VL de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VH de CD3. En otro aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VL de CD3 y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VH de P-CAD. En un aspecto adicional, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que

comprende una VH de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VL de CD3. En otro aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VH de CD3 y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VL de P-CAD.

En otro aspecto del VF-DART, el sub-Dominio 1A y el sub-Dominio 2A se pueden asociar para formar un primer sitio de unión, que tiene un dominio de unión a VL/VH, que se une a un epítopo en CD3 o P-cadherina, y el sub-Dominio 1B y el sub-Dominio 2B se pueden asociar para formar un segundo sitio de unión, que tiene un dominio de unión a VL/VH, que se une a un epítopo en P-cadherina o CD3.

La primera cadena polipeptídica (1) y segunda cadena polipeptídica (2) se pueden unir covalentemente entre sí, por ejemplo en los residuos de cisteína ubicados dentro del primer y segundo dominio promotor del heterodímero. En un aspecto, el residuo de cisteína en el Ligador 2 del primer dominio promotor del heterodímero y el residuo de cisteína en el Ligador 2 del segundo dominio promotor del heterodímero pueden estar unidos por al menos un enlace disulfuro.

En un aspecto de la presente invención, la VL de CD3 puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 48 y la VH de CD3 puede ser una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 47 y 89. En otro aspecto, la VL de P-CAD puede ser una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, y 23 y la VH de P-CAD puede ser una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, y 24. En un aspecto, el Ligador de glicina-serina (Ligador 1) puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGSGGGG (SEQ ID NO: 68) y GGGGSGGGG (SEQ ID NO 69). En un aspecto de la presente invención, el Ligador de cisteína (Ligador 2) del primer dominio promotor del heterodímero puede comprender la secuencia de GFNRGEC (SEQ ID NO: 70) y el Ligador de cisteína (Ligador 2) del segundo dominio promotor del heterodímero puede comprender la secuencia de GVEPKSC (SEQ ID NO: 71). En otro aspecto de la presente invención, el Ligador de cisteína (Ligador 2) del primer dominio promotor del heterodímero puede comprender la secuencia de GVEPKSC (SEQ ID NO: 71) y el Ligador de cisteína (Ligador 2) del segundo dominio promotor del heterodímero puede comprender la secuencia de GFNRGEC (SEQ ID NO: 70).

La secuencias para la primera y segunda cadenas polipeptídicas de las proteínas VF-DART con los diversos anticuerpos anti-P-cadherina y CD3 descriptos en la presente se proporcionan en las Figuras 30A y 30B.

EK-DART que contiene regiones de la espiral E/K

La formación del heterodímero de las dos diferentes cadenas polipeptídicas de un diacuerpo heterodimérico biespecífico también se puede promover mediante el uso de dominios que tienen afinidad por el elemento opuesto y repulsión hacia sí mismos. Un ejemplo de tal Dominio es un dominio superenrollado. Por ejemplo, una primera cadena polipeptídica (1) puede incluir un primer dominio promotor del heterodímero que tiene una región rica en ácido glutámico que forma una espiral alfa-helicoidal cargada negativamente (espiral E), y una segunda cadena polipeptídica (2) puede incluir un segundo dominio promotor del heterodímero que tiene una región rica en lisina que forma una espiral helicoidal cargada positivamente (espiral K), lo que permite una interacción electrostática para promover la formación del heterodímero. La formación del homodímero se puede reducir ya que una espiral E puede tener fuerza repulsiva para otro polipéptido que contiene espiral E y viceversa para la espiral K.

En un aspecto de la presente invención, un diacuerpo heterodimérico biespecífico, conocido como un EK-DART, que se muestra en la Figura 4, comprende una primera cadena polipeptídica (1) y una segunda cadena polipeptídica (2).

En un aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una región de unión a VL de un anticuerpo anti-P-cadherina (VL de P-CAD) o un anticuerpo anti-CD3 (VL de CD3), (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una región de unión a VH de un anticuerpo anti-P-cadherina (VH de P-CAD), si el sub-Dominio 1A comprende una VL de CD3, o un anticuerpo anti-CD3 (VH de CD3), si el sub-Dominio 1A comprende una VL de P-CAD, y el sub-Dominio 1A y sub-Dominio 1B pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 1A y sub-Dominio 1B no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo; y pueden comprender un primer dominio promotor del heterodímero que comprende (i) un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 1B, y (ii) una región de la espiral E unida de modo covalente al Ligador 2.

En otro aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VH de P-CAD o una VH de CD3, (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VL de P-CAD, si el sub-Dominio 1A comprende una VH de CD3, o una VL de CD3, si el sub-Dominio 1A comprende una VH de P-CAD, y el sub-Dominio 1A y sub-Dominio 1B pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el

sub-Dominio 1A y sub-Dominio 1B no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo; y pueden comprender un primer dominio promotor del heterodímero que comprende (i) un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 1B, y (ii) una región de la espiral E unida de modo covalente al Ligador 2.

En un aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VL de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VH de CD3. En otro aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VL de CD3 y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VH de P-CAD. En un aspecto adicional, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VH de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VL de CD3. En otro aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VH de CD3 y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VL de P-CAD.

En un aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una región de unión a VL de un anticuerpo anti-P-cadherina (VL de P-CAD) o un anticuerpo anti-CD3 (VL de CD3) de acuerdo con el dominio de VL seleccionado para sub-Dominio 1A, (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una región de unión a VH de un anticuerpo anti-P-cadherina (VH de P-CAD), si el sub-Dominio 2B comprende una VL de CD3, o un anticuerpo anti-CD3 (VH de CD3), si el sub-Dominio 2B comprende una VL de P-CAD, y el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo; y pueden comprender un segundo dominio promotor del heterodímero que comprende (i) un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 2A y (ii) una región de la espiral K unida de modo covalente al Ligador 2.

En otro aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VH de P-CAD o una VH de CD3, (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VL de P-CAD, si el sub-Dominio 2B comprende una VH de CD3, o una VL de CD3, si el sub-Dominio 2B comprende una VH de P-CAD, y el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A no se asocian para formar un sitio de unión del

epítopo; y pueden comprender un segundo dominio promotor del heterodímero que comprende (i) un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 2A y (ii) una región de la espiral K unida de modo covalente al Ligador 2.

En un aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VL de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VH de CD3. En otro aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VL de CD3 y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VH de P-CAD. En un aspecto adicional, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VH de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VL de CD3. En otro aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VH de CD3 y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VL de P-CAD.

En otro aspecto del EK-DART, el sub-Dominio 1A y el sub-Dominio 2A se pueden asociar para formar un primer sitio de unión, que tiene una región del dominio de unión a VL/VH, que se une a un epítopo en CD3 o P-cadherina, y el sub-Dominio 1B y el sub-Dominio 2B se pueden asociar para formar un segundo sitio de unión, que tiene una región del dominio de unión a VL/VH, que se une a un epítopo en P-cadherina o CD3.

La primera cadena polipeptídica (1) y la segunda cadena polipeptídica (2) se pueden unir covalentemente entre sí, por ejemplo en los residuos de cisteína ubicados dentro del primer y segundo dominio promotor del heterodímero. En un aspecto, el residuo de cisteína en el Ligador 2 del primer dominio promotor del heterodímero y el residuo de cisteína en el Ligador 2 del segundo dominio promotor del heterodímero pueden estar unidos por al menos un enlace disulfuro.

En un aspecto de la presente invención, la VL de CD3 puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 48 y la VH de CD3 puede ser una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 47 y 89. En otro aspecto, la VL de P-CAD puede ser una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, y 23 y la VH de P-CAD puede ser una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, y 24. En un aspecto, el Ligador de glicina-serina (Ligador 1) puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGSGGGG (SEQ ID NO: 68) y GGGGSGGGG (SEQ ID NO 69). En un aspecto de la invención, el Ligador de

cisteína (Ligador 2) del primer dominio promotor del heterodímero y el segundo dominio del heterodímero puede comprender la secuencia de GGCGGG (SEQ ID NO: 72). En un aspecto, el primer dominio promotor del heterodímero también comprende una región rica en ácido glutámico (espiral E) que comprende la secuencia de EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 61). En otro aspecto, el segundo dominio promotor del heterodímero también comprende una región rica en lisina (espiral K) que comprende la secuencia de KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 62).

La Tabla 1 y las Figuras 31A y 31B proporcionan las secuencias para la primera y segunda cadenas polipeptídicas de las proteínas de EK-DART con los diversos anticuerpos anti-P-cadherina y CD3 descriptos en la presente.

Tabla 1. Secuencias de la primera y segunda cadenas polipeptídicas de las proteínas de EK-DART.

EK-DART	Secuencia
35	**P-CAD 35VL X CD3-1VH-ESPIRAL K SEQ ID NO: 80** QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLI YDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSA VVFGGGTKLTVLGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVT VSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
	CD3-1-2VL X P-CAD 35VH-ESPIRAL E SEQ ID NO: 81 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTD TSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTASAFDIWGQGTMVTVSSGGCG GGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK
153	**P-CAD 153VL X CD3-2VH-ESPIRAL K SEQ ID NO: 82** QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLI YDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLS GVVFGGGTKLTVLGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLV TVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
	CD3-1-2VL X P-CAD 153VH-ESPIRAL E SEQ ID NO: 83 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTD TSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFGIWGQGTMVTVSSGGCG GGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

154	**P-CAD 154VL X CD3-2VH-ESPIRAL K SEQ ID NO: 84** QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLI YDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSS YVFGTGTKVTVLGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRD DSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVT VSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
	CD3-1-2VL X P-CAD 154VH-ESPIRAL E SEQ ID NO: 85 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTD TSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTATAFDIWGQGTMVTVSSGGCG GGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK
177	**P-CAD 177VL X CD3-1VH-ESPIRAL K SEQ ID NO: 86** QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLI YDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSA YVFGTGTKVTVLGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVT VSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
	CD3-1-2VL X P-CAD 177VH-ESPIRAL E SEQ ID NO: 87 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTD TSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFDIWGQGTMVTVSSGGCG GGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

Diacuerpos heterodiméricos biespecíficos que comprenden regiones Fc o porciones de estas

La invención abarca diacuerpos heterodiméricos biespecíficos que comprenden regiones o dominios de Fc, o porciones de estos. En ciertos aspectos, la región Fc, o porción de esta comprende uno o más dominios constantes de la región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (por ejemplo, un dominio CH2 o CH3). En otros aspectos, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc o porción de esta, en donde la región Fc o porción de esta comprende al menos una modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustitución) con respecto a una región Fc de tipo silvestre comparable o porción de esta. Las variantes de las regiones Fc son bien conocidas en la técnica, y se utilizan principalmente para alterar el fenotipo del anticuerpo que comprende la variante de la región Fc que se analizó en cualquiera de los ensayos de actividad de unión o función efectora bien conocidos en la técnica, por ejemplo ELISA, análisis de SPR, o ADCC. Tales variantes de las regiones de Fc, o porciones de estas pueden extender la vida media plasmática y la estabilidad exhibida por una molécula

de diacuerpo de la invención que comprende una región Fc o porción de esta. En otros aspectos, la invención abarca el uso de cualquier variante de Fc conocida en la técnica.

En ciertos aspectos, una o más modificaciones en los aminoácidos de la región Fc reducen la afinidad y avidez de la región Fc y, en consecuencia, la molécula de diacuerpo de la invención, para uno o más receptores de FcγR. En un aspecto específico, la invención abarca diacuerpos que comprende una variante de la región Fc, o porción de esta, en donde la variante de la región Fc comprende al menos una modificación de aminoácidos con respecto a una región Fc de tipo silvestre, tal variante de la región Fc solo une un FcγR, en donde el FcγR es FcγRIIIA. En otro aspecto específico, la invención abarca diacuerpos que comprenden una variante de la región Fc, o porción de esta, en donde la variante de la región Fc comprende al menos una modificación de aminoácidos con respecto a una región Fc de tipo silvestre, tal variante de la región Fc solo une un FcγR, en donde el FcγR es FcγRIIA. En otro aspecto específico, la invención abarca diacuerpos que comprende una variante de la región Fc o porción de esta, en donde la variante de la región Fc comprende al menos una modificación de aminoácidos con respecto a una región Fc de tipo silvestre, tal variante de la región Fc solo une un FcγR, en donde el FcγR es FcγRIIB. En ciertos aspectos, la invención abarca moléculas que comprenden una variante de la región Fc en donde la variante confiere o media la disminución de la actividad de ADCC (u otra función efectora) y/o un aumento de la unión a FcγRIIB (CD32B), con respecto a una molécula que no comprende región Fc o que comprende una región Fc de tipo silvestre, medida usando métodos conocidos para los expertos en la técnica y descritos en la presente.

La invención también abarca el uso de una región Fc que comprende dominios o regiones de dos o más isotipos de IgG. Como es conocido en la técnica, la modificación de aminoácidos de la región Fc puede afectar profundamente la función efectora mediada por Fc y/o la actividad de unión. Sin embargo, estas alteraciones en las características funcionales se pueden refinar y/o manipular cuando se implementan en el contexto de los isotipos de IgG seleccionados. Del mismo modo, las características nativas de la Fc del isotipo se pueden manipular mediante una o más modificaciones de aminoácidos. Las múltiples isotipos de IgG (es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) exhiben diferentes propiedades físicas y funcionales que incluyen la vida media sérica, fijación del complemento, afinidad de unión de FcγR y actividades de la función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC) debido a diferencias en la secuencia de

aminoácidos de sus regiones de bisagra y/o Fc. En ciertos aspectos, la modificación de aminoácidos y región Fc de IgG se seleccionan independientemente sobre la base de sus respectivas actividades de unión y/o función efectora separadas con el fin de diseñar un diacuerpo con las características deseadas. En la mayoría de los aspectos, la modificación de aminoácidos y de la región bisagra /Fc de IgG se han ensayado por separado para determinar la unión y/o actividad de la función efectora como se describe en la presente o es conocido en la técnica en el contexto de una IgG1. En ciertos aspectos, la modificación de aminoácidos y de la región bisagra /Fc de IgG muestran una funcionalidad similar, por ejemplo, disminución de la actividad ADCC (u otra función efectora) y/o un aumento de unión a FcγRIIB en el contexto de la molécula diacuerpo u otra molécula que contienen Fc (por ejemplo, inmunoglobulina γ). En otros aspectos, la invención abarca variantes de la región Fc que comprenden combinaciones de las modificaciones de aminoácidos conocidas en la técnica y regiones de IgG seleccionadas que presentan nuevas propiedades, tales propiedades no eran detectables cuando se analizaron las modificaciones y/o regiones de forma independiente como se describe en la presente.

LP-DART

En un aspecto de la presente invención, un diacuerpo heterodimérico biespecífico que tiene una región Fc, denominado LP-DART, se muestra en las Figuras 1 y 5. Un LP- DART puede estar compuesto de dos dominios de scFv que se unen a un antígeno blanco y CD3, que se fusiona a un dominio de Fc de IgG. En un aspecto de la invención, el diacuerpo heterodimérico biespecífico puede estar compuesto de dos dominios de scFv que se unen a P-cadherina y CD3 epsilon, que se fusiona a un dominio de Fc de la IgG1. El particular, las Figuras 1A y 1B muestran cuatro representaciones alternativas de CD3 LP-DART anti-P-cadherina/anti-humana y la Figura 5 muestra un esquema general de un LP-DART ensamblado. La LP-DART es similar a la estructura descripta anteriormente para VF-DART o EK-DART, excepto que el primer y segundo dominio promotor del heterodímero comprenden una región Fc de la inmunoglobulina que tienen dominios CH2 y/o CH3 de una región Fc de la inmunoglobulina, en donde los dominios CH2 y/o CH3 se han alterado para comprender un botón (protuberancia) o un ojal (cavidad). Las modificaciones en la porción Fc del LP-DART se describen a continuación.

En un aspecto de la presente invención, un LP-DART diacuerpo heterodimérico biespecífico, que se muestra en las Figuras 1A, 1B y 5, comprende una primera

cadena polipeptídica (1) y una segunda cadena polipeptídica (2).

En un aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una región de unión a VL de un anticuerpo anti-P-cadherina (VL de P-CAD) o un anticuerpo anti-CD3 (VL de CD3), (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una región de unión a VH de un anticuerpo anti-P-cadherina (VH de P-CAD), si tal sub-Dominio 1A comprende una VL de CD3, o un anticuerpo anti-CD3 (VH de CD3), si tal sub-Dominio 1A comprende una VL de P-CAD, y el sub-Dominio 1A y sub-Dominio 1B pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 1A y sub-Dominio 1B no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo; y pueden comprender un primer dominio promotor del heterodímero que comprende (i) un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 1B y (ii) una región Fc que tiene un dominio CH2 y/o CH3 alterado para comprender una cadena de Fc del botón (protuberancia) o una cadena de Fc del ojal (cavidad) unida de modo covalente al Ligador 2.

En otro aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VH de P-CAD o una VH de CD3, (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VL de P-CAD, si tal sub-Dominio 1A comprende una VH de CD3, o una VL de CD3, si tal sub-Dominio 1A comprende una VH de P-CAD, y el sub-Dominio 1A y sub-Dominio 1B pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 1A y sub-Dominio 1B no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo; y pueden comprender un primer dominio promotor del heterodímero que comprende (i) un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 1B y (ii) una región Fc que tiene un dominio CH2 y/o CH3 alterado para comprender una cadena de Fc del botón (protuberancia) o una cadena de Fc del ojal (cavidad) unida de modo covalente al Ligador 2.

En un aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VL de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VH de CD3. En otro aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VL de CD3 y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VH de P-CAD. En un aspecto adicional, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VH de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VL de CD3. En otro

aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VH de CD3 y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VL de P-CAD.

En un aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una región de unión a VL de un anticuerpo anti-P-cadherina (VL de P-CAD) o un anticuerpo anti-CD3 (VL de CD3) de acuerdo con el dominio de VL seleccionado para sub-Dominio 1A, (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una región de unión a VH de un anticuerpo anti-P-cadherina (VH de P-CAD), si tal sub-Dominio 2B comprende una VL de CD3, o un anticuerpo anti-CD3 (VH de CD3), si tal sub-Dominio 2B comprende una VL de P-CAD, y el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo; y pueden comprender un segundo dominio promotor del heterodímero que comprende (i) ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 2A y (ii) una región Fc que tiene un dominio CH2 y/o CH3 alterado para comprender una cadena de Fc del botón (protuberancia), si tal primera región del heterodímero comprende una cadena de Fc del ojal (cavidad), o una cadena de Fc del ojal (cavidad), si tal primera región del heterodímero comprende una cadena de Fc del botón (protuberancia), unida de modo covalente al Ligador 2.

En otro aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VH de P-CAD o una VH de CD3, (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VL de P-CAD, si tal sub-Dominio 2B comprende una VH de CD3, o una VL de CD3, si tal sub-Dominio 2B comprende una VH de P-CAD, y el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo; y pueden comprender un segundo dominio promotor del heterodímero que comprende (i) un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 2A y (ii) una región Fc que tiene un dominio CH2 y/o CH3 alterado para comprender una cadena de Fc del botón (protuberancia), si tal primera región del heterodímero comprende una cadena de Fc del ojal (cavidad), o una cadena de Fc del ojal (cavidad), si tal primera región del heterodímero comprende una cadena de Fc del botón (protuberancia), unida de modo covalente al Ligador 2.

En un aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un

Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VL de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VH de CD3. En otro aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VL de CD3 y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VH de P-CAD. En un aspecto adicional, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VH de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VL de CD3. En otro aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VH de CD3 y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VL de P-CAD.

En otro aspecto del LP-DART, el sub-Dominio 1A y el sub-Dominio 2A se pueden asociar para formar un primer sitio de unión, que tiene una región del dominio de unión a VL/VH, que se une a un epítopo en CD3 o P-cadherina, y el sub-Dominio 1B y el sub-Dominio 2B se pueden asociar para formar un segundo sitio de unión, que tiene una región del dominio de unión a VL/VH, que se une a un epítopo en P-cadherina o CD3.

La primera cadena polipeptídica (1) y la segunda cadena polipeptídica (2) se pueden unir covalentemente entre sí, por ejemplo en los residuos de cisteína ubicados dentro del primer y segundo dominio promotor del heterodímero. En un aspecto, el residuo de cisteína en el Ligador 2 del primer dominio promotor del heterodímero y el residuo de cisteína en el Ligador 2 del segundo dominio promotor del heterodímero pueden estar unidos por al menos un enlace disulfuro.

En un aspecto de la presente invención, la VL de CD3 puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 48 y la VH de CD3 puede ser una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 47 y 89. En otro aspecto, la VL de P-CAD puede ser una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, y 23 y la VH de P-CAD puede ser una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, y 24. En un aspecto, el Ligador de glicina-serina (Ligador 1) puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGSGGGG (SEQ ID NO: 68) y GGGGSGGGG (SEQ ID NO 69).

En otro aspecto de la invención, el Ligador de cisteína (Ligador 2) puede comprender una región de la bisagra de IgG truncada que tiene la secuencia CPPCP (SEQ ID NO 60) y al menos un residuo de glicina que precede la región bisagra. En un aspecto, el Ligador 2 puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que

consiste en GCPPCP (SEQ ID NO: 73), GGTGGCPPCP (SEQ ID NO 74), GEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO 75) y GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO 76).

En un aspecto, el primer dominio promotor del heterodímero puede comprender una región Fc que tiene un dominio CH2 y/o CH3 alterado para comprender una cadena de Fc del botón (protuberancia) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 63, o una cadena de Fc del ojal (cavidad) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 64. En otro aspecto, el segundo dominio promotor del heterodímero puede comprender una región Fc que tiene un dominio CH2 y/o CH3 alterado para comprender una cadena de Fc del botón (protuberancia) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 63, si tal primera región del heterodímero comprende una cadena de Fc del ojal (cavidad), o una cadena de Fc del ojal (cavidad) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 64, si tal primera región del heterodímero comprende una cadena de Fc del botón (protuberancia).

La Tabla 2 y las Figuras 32A y 32B proporcionan la secuencia de aminoácidos para la primera y segunda cadenas polipeptídicas de las proteínas LP-DART con los diversos Anticuerpos anti-P-cadherina y CD3 descriptos en la presente. Las SEQ ID NOs 117-124 proporcionan las correspondientes secuencias de nucleótidos secuencias qu se mencionan entre paréntesis.

Tabla 2. Secuencias de la primera y segunda cadenas polipeptídicas de las proteínas LP-DART.

LP-DART	Secuencia
35	**P-CAD 35VL x CD3-1VH-Botón**, **SEQ ID NO: 88** QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLI YDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSA VVFGGGTKLTVLGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVT VSSGCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID NO: 117**)

	CD3-1-2VL x P-CAD 35VH-Ojal, SEQ ID NO: 89 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTD TSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTASAFDIWGQGTMVTVSSGCPP CPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID NO: 118**)
153	**P-CAD 153VL x CD3-1VH-Botón (153 LP-DART B), SEQ ID NO: 90** QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLI YDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLS GVVFGGGTKLTVLGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISR DDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLV TVSSGCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID NO: 119**)
	CD3-1-2VL x P-CAD 153VH-Ojal (153 LP-DART A), SEQ ID NO: 91 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTD TSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFGIWGQGTMVTVSSGCPP CPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID NO: 120**)
154	**P-CAD 154VL x CD3-1VH-Botón, SEQ ID NO: 92** QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLI YDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSS YVFGTGTKVTVLGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVT VSSGCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID NO: 121**)

	CD3-1-2VL x P-CAD 154VH-Ojal, SEQ ID NO: 93 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTD TSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTATAFDIWGQGTMVTVSSGCPP CPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID NO: 122**)
177	**P-CAD 177VL x CD3-1VH-Botón, SEQ ID NO: 94** QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLI YDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSA YVFGTGTKVTVLGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVT VSSGCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID NO: 123**)
	CD3-1-2VL x P-CAD 177VH-Ojal, SEQ ID NO: 95 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTD TSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFDIWGQGTMVTVSSGCPP CPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID NO: 124**)

Mutaciones nulas efectoras en CH2-CH3 de IgG1 humana y eliminación de Lys C-terminal

La región Fc de la IgG1 humana se modificó para eliminar el residuo de lisina C-terminal a menudo escindido después de la traducción, así como, la introducción de mutaciones L234A, L235A y G237A usando mutagénesis PCR dirigida al cebador estándar para anular la función efectora debido a la unión a FcγRIII (fenotipo nulo efector).

Mutaciones botón en ojal en CH2-CH3 de IgG1

'Botón en ojal' es una estrategia de diseño efectiva conocida en la técnica de manipulación genética de los homodímeros de cadena pesada del anticuerpo para la heterodimerización. En este enfoque una variante de 'botón' se obtuvo mediante el

reemplazo de un aminoácido pequeño con una más grande en una cadena de la región Fc de IgG1 por ejemplo, Y349C y T366W. El 'botón' fue diseñado para insertar en un "ojal" en el dominio CH3 de la cadena complementaria de la región Fc creada por el reemplazo de un residuo grande con uno más pequeño, por ejemplo, S354C, T366S, L368A y Y407V.

La designación botón-en-ojal es análoga a la denominación protuberancia y cavidad y se puede usar indistintamente.

Una "protuberancia" o "botón" se refiere a al menos una cadena lateral de aminoácido que se proyecta desde la interfaz del primer polipéptido y por lo tanto, se puede ubicar en una cavidad compensatoria en la interfaz adyacente (es decir, la interfaz del segundo polipéptido) con el fin estabilizar el heterodímero, y de este modo,, por ejemplo favorecer la formación de heterodímero respecto de la formación de homodímero. La protuberancia puede existir en la interfaz original o se puede introducir sintéticamente (por ejemplo, mediante la alteración de ácido nucleico que codifica la interfaz). Normalmente, el ácido nucleico que codifica la interfaz del primer polipéptido se altera para codificar la protuberancia. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido "original" en la interfaz del primer polipéptido se reemplaza con ácido nucleico que codifica al menos un residuo “importado” que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo de aminoácido original. El límite superior para el número de residuos originales que se reemplaza es el número total de residuos en la interfaz del primer polipéptido.

Ciertos residuos de importación para la formación de una protuberancia son residuos de aminoácidos generalmente naturales y con preferencia se seleccionan de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

Una "cavidad" u "ojal" se refiere a al menos una cadena lateral de aminoácido que está ahuecada en la interfaz del segundo polipéptido y por lo tanto se adapta a una protuberancia correspondiente en la interfaz adyacente del primer polipéptido. La cavidad puede existir en la interfaz original o se puede introducir sintéticamente (por ejemplo mediante la alteración del ácido nucleico que codifica la interfaz). Normalmente, el ácido nucleico que codifica la interfaz del segundo polipéptido se altera para codificar la cavidad. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido "original" en la interfaz del segundo polipéptido se reemplaza con ADN que codifica al menos un residuo de aminoácido de “importación” que tiene un volumen de cadena lateral más pequeña que el residuo de aminoácido original. El límite superior para el número de residuos originales que se reemplaza es

ell número total de residuos en la interfaz del segundo polipéptido.

Ciertos residuos de importación para la formación de una cavidad son residuos de aminoácidos generalmente naturales y con preferencia se seleccionan de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

Un residuo de aminoácido "original" es uno que se reemplaza con un residuo de "importación" que puede tener un volumen de cadena lateral más pequeña o más grande que el residuo inicial. El residuo de aminoácido de importación puede ser un residuo de aminoácido natural o no natural, pero con preferencia es el primero. Los residuos de aminoácidos "naturales" son los residuos codificados por el código genético. Por residuos de aminoácidos "no naturales" se entiende un residuo que no está codificado por el código genético, pero que es capaz de unirse covalentemente al residuo de aminoácido adyacente en la cadena polipeptídica. Los ejemplos de residuos de aminoácidos no naturales son norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuos de aminoácidos tales como los descritos en, por ejemplo, Ellman et al., Meth. Enzym. 202: 301-336 (1991). El método de la presente invención implica el reemplazo de al menos un residuo de aminoácido original, pero se puede reemplazar más de un residuo original. Normalmente, no más de los residuos totales en la interfaz de la primera o segunda polipéptido pueden comprender residuos de aminoácidos originales que se reemplazan.

La protuberancia o botón es "ubicable" en la cavidad u ojal que significa que la ubicación espacial de la protuberancia y la cavidad en la interfaz del primer polipéptido y el segundo polipéptido, respectivamente, y los tamaños de la protuberancia y la cavidad son tales que la protuberancia se puede ubicar en la cavidad sin perturbar significativamente la asociación normal del primer y segundo polipéptidos en la interfaz. Debido a que las protuberancias tales como Tyr, Phe y Trp normalmente no se extienden perpendicularmente desde el eje de la interfaz, el alineamiento de una protuberancia con una cavidad correspondiente se basa en el modelado del par de protuberancia/cavidad sobre la base una estructura tridimensional tal como la obtenida por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Esto se puede lograr usando técnicas ampliamente aceptado en la técnica.

Por lo tanto, para favorecer la heterodimerización de las regiones Fc resultantes, se introdujeron mutaciones complementarias de tal manera que cada cadena Fc puede portar un conjunto de mutaciones, Y349C y T366W para la cadena Fc del botón (o protuberancia) (SEQ ID NO: 63), o S354C, T366S, L368A y Y407V para la cadena Fc del ojal (o cavidad) (SEQ ID NO: 64), según lo dispuesto en la Tabla

3. Cuando se co-transfectaron en un huésped mamífero adecuado el ADN que codifica las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 63 y 64 producen una región Fc que es predominantemente heterodimérica biespecífica que posee una cadena Fc del botón (o protuberancia) asociada con una cadena Fc del ojal (o cavidad).

Tabla 3. Secuencias de las regiones Fc.

SEQ ID NO:	Secuencia
SEQ ID NO: 63 Mutaciones de la cadena Fc de botón	APEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 64 Mutaciones de la cadena Fc de ojal	APEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Usando la PCR de extensión del cebador por superposición, se introdujo una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción 5' BspEI TCCGGA (SEQ ID NO 67) para usar en la subclonación de las cadenas Fc del botón (protuberancia) y el ojal (cavidad) para cada cadena de DART que contiene un sitio BspEI 3'. Este sitio de restricción codifica una inserción en marco de los aminoácidos serina y glicina (Ser-Gly) en la unión DART-Fc. Las proteínas LP-DART anti-P-cadherina/anti-CD3 se construyeron como se describe en el Ejemplo 6.

Las proteínas LP-DART anti-P-cadherina/anti-CD3 de la presente invención son estables frente a la agregación en los estudios de estabilidad térmica y, fusiones diacuerpo biespecífico-Fc potentes que se dirigen a CD3 y P-cadherina humanas. El dominio Fc botón en ojal permite la mejor expresión en las células CHO y una mejor purificación produce una alta pureza del heterodímero deseado. Las mutaciones diseñadas dentro del dominio Fc anulan la unión a FcγR, de este modo evita potencialmente la reducción de la células T mediada por ADCC. Además, la incorporación del dominio de Fc a una proteína DART mejora la estabilidad de la molécula como se muestra mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y ensayos de agregación forzados en comparación con anticuerpos monoclonales aprobados clínicamente. Además, el dominio Fc mejora el perfil farmacocinético.

MP3 DART

Las Figuras 6 y 7 son representaciones esquemáticas de un diacuerpo heterodimérico biespecífico MP3-DART N-terminal y MP3-DART C-terminal,

respectivamente. Tales proteínas de MP3-DART están compuestas de tres cadenas polipeptídicas: una primera cadena polipeptídica (1), una segunda cadena polipeptídica (2) y una tercera cadena polipeptídica (3).

En un aspecto de la presente invención, una MP3-DART N-terminal, como se muestra en la Figura 6, puede comprender, en una orientación N-terminal a C-terminal, la primera cadena polipeptídica (1) que comprende: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una región de unión a VL de un anticuerpo anti-P-cadherina (VL de P-CAD) o un anticuerpo anti-CD3 (VL de CD3), (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una región de unión a VH de un anticuerpo anti-P-cadherina (VH de P-CAD), si tal sub-Dominio 1A comprende una VL de CD3, o un anticuerpo anti-CD3 (VH de CD3), si tal sub-Dominio 1A comprende una VL de P-CAD, y el sub-Dominio 1A y sub-Dominio 1B pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 1A y sub-Dominio 1B no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo; y pueden comprender un primer dominio promotor del heterodímero que comprende (i) un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 1B, (ii) un Péptido 1 de cisteína en el Ligador 2 y (iii) una región Fc que tiene un dominio CH2 y/o CH3 de un dominio IgG unido covalentemente al Péptido 1.

En otro aspecto de la presente invención, un MP3-DART C-terminal, como se muestra en la Figura 7, puede comprender, en una orientación N-terminal a C-terminal, la primera cadena polipeptídica (1) que comprende: un primer dominio promotor del heterodímero, que comprende (i) un Péptido 1 de cisteína, (ii) una región Fc que tiene dominio CH2 y/o CH3 de un dominio de Fc de IgG, y (iii) un Ligador 3 en la región Fc; y un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una región de unión a VL de un anticuerpo anti-P-cadherina (VL de P-CAD) o un anticuerpo anti-CD3 (VL de CD3), (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una región de unión a VH de un anticuerpo anti-P-cadherina (VH de P-CAD), si tal sub-Dominio 1A comprende una VL de CD3, o un anticuerpo anti-CD3 (VH de CD3), si tal sub-Dominio 1A comprende una VL de P-CAD, y el sub-Dominio 1A y sub-Dominio 1B pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 1A y sub-Dominio 1B no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo, y (iv) un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 1B.

En otro aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) del MP3-DART N-terminal o MP3-DART C-terminal, puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VH de P-CAD o una VH de CD3, (ii) un sub-Dominio

1B que comprende una VL de P-CAD, si tal sub-Dominio 1A comprende una VH de CD3, o una VL de CD3, si tal sub-Dominio 1A comprende una VH de P-CAD.

En un aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) del MP3-DART N-terminal o MP3-DART C-terminal puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VL de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 1B que tiene una VH de CD3. En otro aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VL de CD3 y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VH de P-CAD. En un aspecto adicional, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que comprende una VH de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VL de CD3. En otro aspecto, la primera cadena polipeptídica (1) puede comprender: un Dominio 1, que comprende (i) un sub-Dominio 1A que tiene una VH de CD3 y (ii) un sub-Dominio 1B que comprende una VL de P-CAD.

En un aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) de un MP3-DART N-terminal o MP3-DART C-terminal puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una región de unión a VL de un anticuerpo anti-P-cadherina (VL de P-CAD) o un anticuerpo anti-CD3 (VL de CD3) de acuerdo con el dominio VL seleccionado para la primera cadena polipeptídica del MP3-DART, (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una región de unión a VH de un anticuerpo anti-P-cadherina (VH de P-CAD), si tal sub-Dominio 2B comprende una VL de CD3, o un anticuerpo anti-CD3 (VH de CD3), si tal sub-Dominio 2B comprende una VL de P-CAD, y el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A pueden estar covalentemente unidos por un ligador de glicina-serina (Ligador 1) de modo que el sub-Dominio 2B y el sub-Dominio 2A no se asocian para formar un sitio de unión del epítopo; y pueden comprender un segundo dominio promotor del heterodímero que comprende un ligador de cisteína (Ligador 2) en el sub-Dominio 2A.

En otro aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VH de P-CAD o una VH de CD3, (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VL de P-CAD, si tal sub-Dominio 2B comprende una VH de CD3, o una VL de CD3, si tal sub-Dominio 2B comprende una VH de P-CAD.

En un aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VL de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 2A que tiene una VH de CD3. En otro aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio

2B que comprende una VL de CD3 y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VH de P-CAD. En un aspecto adicional, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VH de P-CAD y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VL de CD3. En otro aspecto, la segunda cadena polipeptídica (2) puede comprender: un Dominio 2, que comprende (i) un sub-Dominio 2B que comprende una VH de CD3 y (ii) un sub-Dominio 2A que comprende una VL de P-CAD.

En un aspecto, la tercera cadena polipeptídica (3) de un MP3-DART N-terminal o MP3-DART C-terminal, en una orientación N-terminal a C-terminal, puede comprender: un tercer dominio promotor del heterodímero que comprende (i) un Péptido 1 de cisteína y (ii) una región Fc que tiene un dominio CH2 y/o CH3 de un dominio de Fc de IgG.

En un aspecto de la invención, el sub-Dominio 1A y el sub-Dominio 2A se pueden asociar para formar un primer sitio de unión, que tiene una región VL/VH, que se une a un epítopo en CD3 o P-cadherina, y el sub-Dominio 1B y el sub-Dominio 2B se pueden asociar para formar un segundo sitio de unión, que tiene una región VL/VH, que se une a un epítopo en P-cadherina o CD3.

La primera cadena polipeptídica (1) y segunda cadena polipeptídica (2) se pueden unir covalentemente entre sí, por ejemplo en los residuos de cisteína ubicados dentro del primer y segundo dominio promotor del heterodímero. En un aspecto, el residuo de cisteína en el Ligador 2 en el primer dominio promotor del heterodímero y el residuo de cisteína en el Ligador 2 en la segunda región promotora del heterodímero pueden estar unidos por al menos one enlace disulfuro.

El primer dominio promotor del heterodímero de la primera cadena polipeptídica (1) y el tercer dominio promotor del heterodímero de la tercera cadena polipeptídica (3) se pueden asociar entre sí para formar una región Fc de la inmunogloobulina. La primera cadena polipeptídica (1) y la tercera cadena polipeptídica (3) se pueden unir covalentemente entre sí, por ejemplo en los residuos de cisteína ubicados dentro del primer y tercer dominio promotor del heterodímero. En otro aspecto, el residuo de cisteína en el Péptido 1 en el primer dominio promotor del heterodímero y el residuo de cisteína en el Péptido 1 en el tercer dominio promotor del heterodímero pueden estar unidos por al menos un enlace disulfuro.

En un aspecto de la presente invención, la VL de CD3 puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 48 y la VH de CD3 puede ser una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 47 y 89. En otro aspecto, la VL de P-CAD

puede ser una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, y 23 y la VH de P-CAD puede ser una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, y 24. En un aspecto, el Ligador de glicina-serina (Ligador 1) puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGSGGGG (SEQ ID NO: 68) y GGGGSGGGG (SEQ ID NO 69).

En un aspecto de la presente invención, el Ligador de cisteína (Ligador 2) puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GFNRGEC (SEQ ID NO: 70) y GVEPKSC (SEQ ID NO: 71). En otro aspecto el Ligador de cisteína (Ligador 2) del primer dominio promotor del heterodímero puede comprender la secuencia de GFNRGEC (SEQ ID NO: 70) y el Ligador de cisteína (Ligador 2) del segundo dominio promotor del heterodímero puede comprender la secuencia de GVEPKSC (SEQ ID NO: 71).

En ciertos aspectos, el Ligador 3 de la tercera región promotora del heterodímero puede comprender la secuencia de KAPSSSPME (SEQ ID NO 77).

En ciertos aspectos, el Péptido 1 en la primera y tercera región promotora del heterodímero puede comprender una región de la bisagra de IgG truncada que tiene la secuencia CPPCP (SEQ ID NO 60). En un aspecto, el Péptido 1 puede comprender, pero sin limitación, la secuencia de DKTHTCPPCP (SEQ ID NO 96).

La estrategia de botón en ojal descripta en la presente se puede usar en los constructos de MP3-DART para asegurar el apareamiento apropiado de la primera y tercera cadena polipeptídicas. De modo similar al LP-DART descripto en la presente, la región Fc de la IgG1 humana se puede modificar para eliminar el residuo de lisina C-terminal a menudo escindido después de la traducción, así como, para introducir las mutaciones L234A, L235A y G237A para anular la función efectora debido a la unión a FcγRIII (fenotipo nulo efector). En un aspecto se crea un botón mediante la modificación de una región Fc de IgG nativa para contener la modificación T366W. En otro aspecto se crea un ojal mediante la modificación de una región Fc de IgG nativa para contener la modificación T366S, L368A y Y407V. Con preferencia la primera cadena polipeptídica comprende el botón y la tercera cadena polipeptídica comprende el ojal. Para ayudar en la purificación de MP3-DART^{TM} de cualquier homodímero de la tercera cadena polipeptídica, el sitio de unión de la proteína A de los dominios CH2 y CH3 de la tercera cadena polipeptídica con preferencia muta por la sustitución del aminoácido en la posición 435 (H435R). En consecuencia, ningún homodímero de la tercera cadena polipeptídica se une a la proteína A, mientras que MP3-DART^{TM} retiene

su capacidad de unirse a la proteína A por medio del sitio de unión de la proteína A en la primera cadena polipeptídica. En consecuencia, la cadena de Fc del botón (o protuberancia) puede tener las secuencias de la SEQ ID NO: 65 y la cadena Fc del ojal (o cavidad) puede tener la secuencia de la SEQ ID NO: 66, que se proporciona en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de regiones de Fc.

SEQ ID NO:	**Secuencia**
SEQ ID 65 Mutaciones de cadena Fc de Botón	APEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNRYTQKSLSLSPGK
SEQ ID 66 Mutaciones de cadena Fc de Ojal	APEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK

La Tabla 5 describe las cadenas polipeptídicas primera (1), segunda (2) y tercera (3) de ejemplos de proteínas N-terminal MP3- DART y C-terminal MP3- DART que fueron construidas con los diversos anticuerpos de P-cadherina y CD3-1 descritos en la presente. Las SEQ ID NOs 125-158 proveen las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos (referidas en paréntesis) para las cadenas polipeptídicas 1, 2 y 3 para los diacuerpos heterodiméricos N-terminal y C-terminal MP3- DART descritos en la Tabla 5.

Tabla 5. Cadenas polipeptídicas primera, segunda y tercera de proteínas MP3- DART.

	Secuencias de la primera cadena polipeptídica (1)	**Secuencias de la segunda cadena polipeptídica (2)**	**Secuencias de la tercera cadena polipeptídica (3)**
C-terminal MP3-DART P-CAD 35 VH y VL	**P-CAD 35VLXCD3-1VH** SEQ ID NO: 127 (SEQ ID NO: 128)	**CD3-1-2VLXP-CAD 35VH** SEQ ID NO: 129 (SEQ ID NO: 130)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)
C-terminal MP3-DART P-CAD153 VH y VL	**P-CAD 153VLXCD3-1VH** SEQ ID NO: 131 (SEQ ID NO: 132)	**CD3-1-2VLXP-CAD 153VH** SEQ ID NO: 133 (SEQ ID NO: 134)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)
C-terminal MP3-DART P-CAD154 VH y VL	**P-CAD 154VLXCD3-1VH** SEQ ID NO: 135 (SEQ ID NO: 136)	**CD3-1-2VLXP-CAD 154VH** SEQ ID NO: 137 (SEQ ID NO: 138)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)

C-terminal MP3-DART P-CAD177 VH y VL	**P-CAD 177VLXCD3-1VH** SEQ ID NO: 139 (SEQ ID NO: 140)	**CD3-1-2VLXP-CAD 177VH** SEQ ID NO: 141 (SEQ ID NO: 142)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)
N-terminal MP3-DART P-CAD 35 VH y VL	**P-CAD 35VLXCD3-1VH** SEQ ID NO: 143 (SEQ ID NO: 144)	**CD3-1-2VLXP-CAD 35VH** SEQ ID NO: 145 (SEQ ID NO: 146)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)
N-terminal MP3-DART P-CAD 153 VH y VL	**P-CAD 153VLXCD3-1VH** SEQ ID NO: 147 (SEQ ID NO: 148)	**CD3-1-2VLXP-CAD 153VH** SEQ ID NO: 149 (SEQ ID NO: 150)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)
N-terminal MP3-DART P-CAD 154 VH y VL	**P-CAD 154VLXCD3-1VH** SEQ ID NO: 151 (SEQ ID NO: 152)	**CD3-1-2VLXP-CAD 154VH** SEQ ID NO: 153 (SEQ ID NO: 154)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)
N-terminal MP3 DART P-CAD 177 VH y VL	**P-CAD 177VLXCD3-1VH** SEQ ID NO: 155 (SEQ ID NO: 156)	**CD3-1-2VLXP-CAD 177VH** SEQ ID NO: 157 (SEQ ID NO: 158)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)

Residuos diseñados de cisteína

En determinados aspectos, cada cadena polipeptídica del díacuerpo heterodimérico biespecífico puede estar diseñada de manera de comprender por lo menos un residuo cisteína que puede interactuar con un residuo cisteína contraparte en otra cadena polipeptídica de la cadena de manera de formar un enlace disulfuro intercadena. Los enlaces disulfuro intercadena pueden servir para estabilizar la molécula del díacuerpo, mejorar la expresión y recuperación en los sistemas recombinantes, resultando una formulación estable y coherente, además de mejorar la estabilidad *in vivo* del producto aislado y/o purificado. El o los residuos de cisteína pueden ser introducidos como un único aminoácido o como parte de una secuencia de aminoácidos más larga, por ejemplo, una región bisagra, en cualquier porción de la cadena polipeptídica. En un aspecto específico, el diseño implica que por lo menos un residuo de cisteína se presenta en el terminal-C de la cadena polipeptídica.

Tratamiento del cáncer

La invención comprende métodos y composiciones para el tratamiento, prevención, o control del cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un diacuerpo heterodimérico biespecífico diseñado de acuerdo con la invención, la cual molécula se liga además a un antígeno de cáncer. Las moléculas de la invención pueden ser particularmente útiles para la prevención, inhibición, reducción del crecimiento y/o regresión de los tumores

primarios y de la metástasis por las células cancerosas. Si bien no deseamos quedar comprometidos con ningún mecanismo de acción en particular, las moléculas de la invención pueden mediar una función efectora que puede resultar en una eliminación del tumor, reducción del tumor o una combinación de éstas.

Por lo tanto, la invención provee métodos para prevenir o tratar el cáncer, caracterizados por un antígeno de cáncer P-cadherina mediante el diseño del diacuerpo heterodimérico biespecífico de manera que reconozca de manera inmunoespecífica el antígeno de cáncer P-cadherina y un antígeno de CD3 sobre las células T. Los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos que han sido diseñados de acuerdo con la invención son útiles para la prevención o tratamiento del cáncer, por cuanto tienen una actividad citotóxica con respecto a las células T killer activadas inducidas por el anti-CD3.

Por ello, en un aspecto de la presente invención se provee un método para tratar el cáncer positivo a P-cadherina en un paciente que lo necesite, en donde el cáncer está seleccionado entre el grupo consistente en cáncer de mama, colorrectal, gástrico, de tiroides, de próstata, de cuello uterino, pancreático, pulmonar (lo que incluye sin limitación cáncer pulmonar de células no pequeñas y cáncer pulmonar de células pequeñas), de vejiga, hepático, de cabeza y cuello, de testículos, y glioblastoma.

La invención también provee un diacuerpo heterodimérico biespecífico de la invención destinado a ser utilizado en el método para tratar el cáncer, definido en la presente. Además, la invención provee la utilización de un diacuerpo heterodimérico biespecífico de la invención en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer, definido en la presente.

En un aspecto específico, un diacuerpo heterodimérico biespecífico de la invención inhibe o reduce el crecimiento de las células de cáncer en por lo menos un 99%, en por lo menos un 95%, en por lo menos un 90%, en por lo menos un 85%, en por lo menos un 80%, en por lo menos un 75%, en por lo menos un 70%, en por lo menos un 60%, en por lo menos un 50%, en por lo menos un 45%, en por lo menos un 40%, en por lo menos un 45%, en por lo menos un 35%, en por lo menos un 30%, en por lo menos un 25%, en por lo menos un 20% o en por lo menos un 10%, referido al crecimiento de las células de cáncer en la ausencia del diacuerpo heterodimérico biespecífico de la invención.

En un aspecto específico, un diacuerpo heterodimérico biespecífico de la invención elimina células, o inhibe o reduce el crecimiento de células de cáncer en por

lo menos un 5%, en por lo menos un 10%, en por lo menos un 20%, en por lo menos un 25%, en por lo menos un 30%, en por lo menos un 35%, en por lo menos un 40%, en por lo menos un 45%, en por lo menos un 50%, en por lo menos un 60%, en por lo menos un 70%, en por lo menos un 75%, en por lo menos un 80%, en por lo menos un 85%, en por lo menos un 90%, en por lo menos un 95%, o en por lo menos un 100%, de mejor manera que en la ausencia del diacuerpo heterodimérico biespecífico de la invención.

La invención comprende además administrar las moléculas de la invención en combinación con otras terapias conocidas de las personas expertas para el tratamiento o prevención de cáncer, lo incluye sin limitación, las quimioterapias estándar vigentes y experimentales, las terapias biológicas, las inmunoterapias, las terapias por radiación, o la cirugía. En algunos aspectos, las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de uno o más agentes, anticuerpos terapéuticos u otros agentes conocidos por los expertos para el tratamiento y/o prevención del cáncer.

Por lo tanto, los métodos para tratar el cáncer incluyen administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de un diacuerpo heterodimérico biespecífico de la presente invención en combinación con un agente quimioterapéutico. Un tratamiento combinado de este tipo puede administrarse por separado, de manera consecutiva o al mismo tiempo. Los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen sin limitación: 5-fluoruracilo, asparaginasa, BCNU, bleomicina, caliqueamicina, las camptotecinas, carboplatin, cisplatin, ciclofosfamida, citarabina, citoxano, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, docetaxel, doxorubicina, etopósido, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecan, L-asparaginasa, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, paclitaxel, plicamicina, procarbizina, taxol, tioguanina, topotecan, vinblastina, vincristina, y vinorelbina.

Las cantidades dosificadas y las frecuencias de administración provistas en la presente se encuentran abarcadas por las expresiones “terapéuticamente efectivo” y “profilácticamente efectivo”. Además, la dosificación y la frecuencia pueden variar en función de factores específicos para cada paciente, en función de los agentes terapéuticos o profilácticos específicamente administrados, la gravedad y tipo de cáncer, la vía de administración, como también la edad, peso corporal, respuesta e historia clínica anterior del paciente. Los regímenes adecuados pueden ser seleccionados por la persona experta por el hecho de tener en cuenta tales factores y

observándose, por ejemplo, las dosificaciones indicadas en la bibliografía técnica especializada y recomendadas en la obra: Physician's Desk Reference (56th ed., 2002).

Los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos de la presente invención pueden hallarse presentes en forma de una composición farmacéutica adecuada para la administración que ha sido formulada de manera de ser adecuada para el modo de administración seleccionado, y diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como tampones, agentes tensioactivos, agentes de conservación, agentes de solubilización, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes, portadores, y similares. La obra: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton Pa., 18th ed., 1995, provee un compendio de técnicas de formulación generalmente conocidas de las personas expertas.

Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante cualquier medio conocido en la técnica que permita lograr la finalidad generalmente prevista para tratar el cáncer. La vía de administración puede ser parenteral, lo que en la presente se refiere a modos de administración que incluyen sin limitación la inyección o infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, e intraarticular. La dosificación administrada puede variar en función de la edad, salud general y peso corporal del paciente receptor, tipo de tratamiento simultáneo, en caso de haberlo, la frecuencia del tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado.

Las composiciones situadas dentro de los alcances de la invención incluyen la totalidad de las composiciones en las que se halla presente un diacuerpo heterodimérico biespecífico en una cantidad que es efectiva para lograr el efecto médico deseado en el tratamiento del cáncer. Si bien las necesidades individuales pueden variar de un paciente a otro, la determinación de los intervalos óptimos de las cantidades efectivas de la totalidad de los componentes se halla dentro de la capacidad del médico clínico con la pericia habitual.

La presente invención provee kits que pueden utilizarse en los métodos anteriormente descritos. En un aspecto, un kit comprende un diacuerpo heterodimérico biespecífico de la invención. En otro aspecto, un kit comprende además uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más contenedores. En determinados aspectos, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente quimioterapéutico. En otros aspectos, el agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico biológico u hormonal.

Diversos aspectos de las composiciones farmacéuticas, agentes profilácticos o

terapéuticos de la invención son preferiblemente sometidos a ensayos *in vitro*, en un sistema de cultivo celular, y en un organismo modelo animal, tal como un sistema de modelo animal roedor, para determinar la actividad terapéutica deseada antes de su utilización en los seres humanos.

La toxicidad y eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos de la presente invención pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o mediante experimentos en animales, por ejemplo, para determinar el LD_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y el ED_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el denominado "índice terapéutico", y se lo puede expresar como la relación LD_{50}/ED_{50}. Se prefieren agentes profilácticos y/o terapéuticos que presenten grandes índices terapéuticos.

Además, pueden utilizarse cualesquiera ensayos conocidos por los expertos para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias, o de las terapias combinadas, reveladas en la presente para el tratamiento o prevención del cáncer.

Registros biológicos

Materiales representativos de la presente invención fueron registrados en el American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, EE.UU. (ATCC) el 20 diciembre de 2013. El vector 153 LP-DART A que tiene el ATCC Accession No. PTA-120809 comprende un inserto de ADN humano recombinante que codifica la Cadena A de P-cadherina LP-DART (Fc-diacuerpo de fusión, y el vector 153 LP-DART B que tiene el ATCC Accession No. PTA-120810 comprende un inserto de ADN humano recombinante que codifica la Cadena B de P-cadherina LP-DART (Fc-diacuerpo de fusión). Los registros fueron efectuados bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest relacionados con el Reconocimiento Internacional del Registro de Microorganismos (Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms) a los efectos de los procedimientos y regulaciones para patentes indicados a continuación (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del registro durante 30 años a partir de la fecha de registro. El Registro será puesto a disposición por el ATCC bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest, y sujeto a un acuerdo entre Pfizer Inc y ATCC, que asegure la disponibilidad permanente e irrestricta de la progenie del cultivo del registro al público al emitirse la pertinente patente EE.UU. o la disponibilidad pública de cualquier solicitud de patente de Estados Unidos o extranjera, y asegura la

disponibilidad de la progenie a alguien que de acuerdo con el Comisionado EE.UU. de Patentes y Marcas Comerciales tenga el derecho de acceder a la misma de acuerdo con el 35 U.S.C. Section 122 y las pertinentes reglamentaciones del Comisionado (inclusive 37 C.F.R. Section 1,14 y con particular referencia a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha dado su consentimiento para que, en el caso en que se pierda o destruya un cultivo de los materiales registrados al ser cultivados bajo condiciones adecuadas, los materiales serán rápidamente reemplazados por otros idénticos en cuanto se reciba la notificación correspondiente. La disponibilidad del material registrado no debe interpretarse como una licencia para llevar la invención a la práctica en contravención a los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

Se presentan los siguientes ejemplos de aspectos específicos para llevar a cabo la presente invención, a fines de ilustración solamente; no tienen por objeto limitar de ninguna manera los alcances de la presente invención.

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos de P-cadherina y de diacuerpos heterodiméricos biespecíficos

Se construyeron diacuerpos heterodiméricos biespecíficos para evaluar la producción recombinante, purificación y características de ligación de cada uno de ellos. Los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos purificados en afinidad fueron producidos mediante los sistemas de expresión recombinante descritos en la presente. Los análisis de ELISA y de SPR revelaron además que los diacuerpos heterodiméricos biespecíficos covalentes presentaban una afinidad para ambos antígenos apuntados, la P-cadherina y el CD-3, y que podían ligarse a ambos antígenos.

A. Visualización de fagos

Unas partes de variables de fragmento de cadena simple (scFv) que se ligan al dominio extracelular (ECD) de la P-cadherina fueron identificadas con un biblioteca de visualización de fagos compuesta de scFv derivados de donantes humanos no inmunizados para lo cual se utilizaron técnicas conocidas en la técnica. La ligación de los scFv expresados sobre la superficie de los fagos fue medida sobre constructos de proteína P-cadherina y de células que expresan P-cadherina mediante técnicas de ELISA estándar.

B. Ensayos de secuenciado

Unos fragmentos de ScFv fueron secuenciados con cebadores 5' GGAGATTTTCAACGTGAA 3' (SEQ ID NO: 58) y 5' CTCTTCTGAGATGAGTTTTTG 3' (SEQ ID NO: 59) sea en forma de stock bacteriano en glicerol sin purificar sea como plásmido purificado, para lo cual se utilizaron métodos convencionales.

C. Conversión a DART

Unos fragmentos ScFv que demostraron una fuerte ligación a P-cadherina recombinante o a la superficie de células (>3x segundo plano o ligación negativa de células) fueron seleccionados para la subclonación en proteínas DART. El diseño de DART y los métodos de clonación han sido anteriormente descritos (Johnson et al., J Mol Biol, 399:436-449, 2010; Moore et al, Blood, 117(17):4542-51, 2011). Los métodos para la adaptación del novedoso scFv anti-P-cadherina a partir de la biblioteca de visualización de fagos son como sigue: unos fragmentos amplificados mediante PCR (polymerase cadena reaction, reacción de cadena de polimerasa) con cebadores que tenían BamHI/ BspEI para VH y BssHII/BamHI para VL. Los fragmentos fueron cortados con correspondientes enzimas de restricción de acuerdo con las especificaciones del fabricante (New England Biolabs).

Para generar un vector de expresión DART, el anti-P-cadherina VH (P-CAD VH) o VL (P-CAD VL) scFv fueron purificados sobre gel (QIAGEN® Gel Purification Kit) y ligados por separado en vectores de expresión de mamífero que contenían scFv sea anti-CD3 VL (CD3 VL) sea VH (CD3 VH) scFv.

Para la generación de un VF-DART, como se muestra en las Figura 2 y 3, el vector de expresión DART comprendía además un primer y segundo dominio promotor de heterodímero que tiene un ligador de cisteína (Ligador 2), tal como GFNRGEC (SEQ ID NO: 70) o GVEPKSC (SEQ ID NO: 77).

Para generar un EK-DART, como se muestra en la Figura 4, el vector de expresión DART comprendía además un primer y segundo dominio promotor de heterodímero, cada uno de los cuales tiene un ligador de cisteína (Ligador 2), tal como GGCGGG (SEQ ID NO: 72), y sea un dominio E-espiral (SEQ ID NO: 61) sea un dominio a K-espiral (SEQ ID NO: 62).

Para generar un LP-DART, como se muestra en las Figuras 1 y 5, los vectores de expresión DART comprendían además un primer y un segundo dominio promotor de heterodímero cada uno de los cuales tiene un ligador de cisteína (Ligador 2), tal como GCPPCP (SEQ ID NO: 73), GGTGGCPPCP (SEQ ID NO 74),

GEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO 75), o GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO 76), y sea una cadena “botón” (SEQ ID NO: 63) sea una cadena “ojal” (SEQ ID NO: 64).

Además del novedoso scFv anti-P-cadherina de la biblioteca de visualización de fagos, los dominios VH y VL del mAb PF-03732010 clínico anti-P-cadherina (Zhang et al, Clin cáncer Res. 16(21), 5177-5188, 2010) también fueron subclonados en los diversos factores de expresión DART anteriormente descritos para que actúen como un control positivo.

Las proteínas DART fueron seguidamente expresadas de manera transitoria en células de mamífero mediante la cotransfección de vectores de expresión en células HEK 293. Las proteínas DART que retuvieron la afinidad con P-cadherina fueron purificadas por afinidad utilizando mAb 15F1 anti-espiralado-espiral acoplado a sefarosa 4B activado con CNBr (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Las propiedades bioquímicas de las proteínas DART purificadas fueron evaluadas mediante SDS-PAGE y SEC.

La Tabla 6 provee las secuencias de aminoácidos VL y VH para los clones de scFv anti-P-cadherina generados mediante las técnicas descritas en la presente. Los CDR para los clones 20 y 30 han sido subrayados de acuerdo con Kabat. Las SEQ ID NOs 97-116 proveen las correspondientes secuencias de nucleótidos referidas en paréntesis.

Tabla 6. Secuencias de P-CAD VL y VH.

SEQ ID NO. P-CAD Clon #	**SECUENCIA**
SEQ ID NO: 1 P-CAD 33 VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTA PKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GTWDSSLSAYVFGTGTKVTVL
SEQ ID NO: 2 P-CAD 33 VH	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCALIGSGVAFDIWGQGTMVTVSS
SEQ ID NO: 3 P-CAD 34 VL	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTA PKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 4 P-CAD 34 VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCATIDTASAFDIWGQGTMVTVSS
SEQ ID NO: 5 P-CAD 35 VL (SEQ ID NO: 97)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTA PKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GTWDSSLSAVVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 6 P-CAD 35 VH (SEQ ID NO: 98)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCATIDTASAFDIWGQGTMVTVSS

SEQ ID NO: 7 P-CAD 153 VL (SEQ ID NO: 99)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTA PKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GTWDSSLSGVVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 8 P-CAD 153 VH (SEQ ID NO: 100)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCATIDTANAFGIWGQGTMVTVSS
SEQ ID NO: 9 P-CAD 154 VL (SEQ ID NO: 101)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTA PKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GTWDSSLSSYVFGTGTKVTVL
SEQ ID NO: 10 P-CAD 154 VH (SEQ ID NO: 102)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCATIDTATAFDIWGQGTMVTVSS
SEQ ID NO: 11 P-CAD 163 VL (SEQ ID NO: 103)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTA PKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GTWDSSLSAYVFGTGTKVTVL
SEQ ID NO: 12 P-CAD 163 VH (SEQ ID NO: 104)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGFSWMRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCATIDTASAFDIWGQGTMVTVSS
SEQ ID NO: 13 P-CAD 165 VL (SEQ ID NO: 105)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTA PKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQAGDEADYYC GTWDSSLSAYVFGTGTKVTVL
SEQ ID NO: 14 P-CAD 165 VH (SEQ ID NO: 106)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCATIDTANAFDIWGQGTMVTVSS
SEQ ID NO: 15 P-CAD 177 VL (SEQ ID NO: 107)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTA PKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GTWDSSLSAYVFGTGTKVTVL
SEQ ID NO: 16 P-CAD 177 VH (SEQ ID NO: 108)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCATIDTANAFDIWGQGTMVTVSS
SEQ ID NO: 17 P-CAD 178 VL (SEQ ID NO: 109)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTA PKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GTWDSSLSAVVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 18 P-CAD 178 VH (SEQ ID NO: 110)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCATIDTANAFDIWGQGTMVTVSS
SEQ ID NO: 19 P-CAD 179 VL (SEQ ID NO: 111)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSRSNIGNNYVSWYQQLPGTA PKLLIYDSNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCG TWDSSLSSWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 20 P-CAD 179 VH (SEQ ID NO: 112)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCATIDTANAFDIWGQGTMVTVSS
SEQ ID NO: 21 P-CAD 180 VL (SEQ ID NO: 113)	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTA PKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GTWDSSLSAYVFGTGTKVTVL
SEQ ID NO: 22 P-CAD 180 VH (SEQ ID NO: 114)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCATIDTANAFDIWGQGTMVTVSS
SEQ ID NO: 23 P-CAD 281 VL (SEQ ID NO: 115)	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTA PKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 24 P-CAD 281 VH (SEQ ID NO: 116)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCATINAPNNFDIWGQGTMVTVSS
SEQ ID NO: 236 P-CAD 20 VL	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGKYLNWYQQIPGKAPK LLIYTASTLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIVSLQPEDFATYYCQQS FNTPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 237 P-CAD 20 VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ GLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCAKGSGSGAFDIWGQGTMVTVSS
SEQ ID NO: 238 P-CAD 30 VL	DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWFQQRP GQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQGTHWPPLFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 239 P-CAD 30 VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKSSSDRTFDYWGQGTLVTVSS

Las Tablas 7a y 7b proveen las secuencias de CDR para los clones scFV anti-P-cadherina VH generados, utilizándose las designaciones de acuerdo con la numeración de Kabat y AbM, respectivamente.

Tabla 7a. Secuencias de P-CAD VH CDR en las que se utiliza la numeración de Kabat.

P-CAD scFv Clon #	P-CAD VH CDR1	P-CAD VH CDR2	P-CAD VH CDR3
33	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQKLQG SEQ ID NO: 26	IGSGVAFDI SEQ ID NO: 27
34	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQKLQG SEQ ID NO: 26	IDTASAFDI SEQ ID NO: 28
35	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQKLQG SEQ ID NO: 26	IDTASAFDI SEQ ID NO: 28
153	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQKLQG SEQ ID NO: 26	IDTANAFGI SEQ ID NO: 29

154	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQKLQG SEQ ID NO: 26	IDTATAFDI SEQ ID NO: 30
163	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQKLQG SEQ ID NO: 26	IDTASAFDI SEQ ID NO: 28
165	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQKLQG SEQ ID NO: 26	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
177	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQKLQG SEQ ID NO: 26	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
178	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQKLQG SEQ ID NO: 26	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
179	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQKLQG SEQ ID NO: 26	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
180	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQKLQG SEQ ID NO: 26	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
281	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQKLQG SEQ ID NO: 26	INAPNNFDI SEQ ID NO: 32

Tabla 7b. Secuencias de P-CAD VH CDR en las que se utiliza la numeración de AbM.

P-CAD scFv Clon #	P-CAD VH CDR1	P-CAD VH CDR2	P-CAD VH CDR3
33	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IGSGVAFDI SEQ ID NO: 27
34	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTASAFDI SEQ ID NO: 28
35	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTASAFDI SEQ ID NO: 28
153	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTANAFGI SEQ ID NO: 29
154	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTATAFDI SEQ ID NO: 30
163	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTASAFDI SEQ ID NO: 28
165	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
177	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
178	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
179	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
180	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
281	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	INAPNNFDI SEQ ID NO: 32

La Tabla 7c provee las secuencias de CDR para los clones scFv anti-P-cadherina VL generados.

Tabla 7c. Secuencias de P-CAD VL CDR en las que utiliza la numeración de Kabat/AbM.

P-CAD scFv Clon #	P-CAD VL CDR1	P-CAD VL CDR2	P-CAD VL CDR3
33	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAYV SEQ ID NO: 39
34	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAWV SEQ ID NO: 40
35	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAVV SEQ ID NO: 41
153	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSGVV SEQ ID NO: 42
154	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSSYV SEQ ID NO: 43
163	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAYV SEQ ID NO: 39
165	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAYV SEQ ID NO: 39
177	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAYV SEQ ID NO: 39
178	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAVV SEQ ID NO: 41
179	SGSRSNIGNNYVS SEQ ID NO: 36	DSNKRPS SEQ ID NO: 38	GTWDSSLSSWV SEQ ID NO: 44
180	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAYV SEQ ID NO: 39
281	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAWV SEQ ID NO: 40

La Tabla 8 muestra las mutaciones de aminoácidos halladas en clones P-cadherina madurados en afinidad. Los datos sugieren potenciales efectos sobre el plegado de VL/VH y sobre la interacción del ligando sobre la base de la estructura cristalina resuelta. Las mutaciones dentro del bolsillo de ligación de CDR mostraron un potencial para una interacción mejorada del ligando. Las mutaciones halladas fuera del bolsillo de ligación de CDR sugieren un rol para un plegado mejorado de VL/VH.

Tabla 8. Mutaciones de aminoácidos de clones P-cadherina madurados en afinidad.

	VL mutaciones P-CAD 35			**VH mutaciones P-CAD 35**		
P-CAD Clon #	**Secuencial**	**Cadena VL**	**Chothia de VL**	**Secuencial**	**Cadena de VH**	**Chothia de VH**
153	A98G	A98G	A95BG	S103N, D106G	S221N, D224G	S99N, D101G
154	A98S (V99Y, G103T, L107V)	A98S V99Y G103T L107V	A95BS V96Y G100T L104V	S103T	S221T	S99T
165	T81A (V99Y, G103T, L107V)	T81A V99Y G103T L107V	T80A V96Y G100T L104V	S103N	S221N	S99N
177	(V99Y, G103T, L107V)	V99Y G103T L107V	V96Y G100T L104V	S103N	S221N	S99N
178	-	-	-	S103N	S221N	S99N
179	S26R, N52S, A98S, V99W	S26R N52S A98S V99W	S27R N51S A95BS V96W	S103N	S221N	S99N

180	L4V, (V99Y, G103T, L107V)	L4V V99Y G103T L107V	L4V V96Y G100T L104V	S103N	S221N	S99N

La Tabla 9 provee las secuencias de aminoácidos VL y VH para los clones scFv anti-CD3 scFv generados mediante las técnicas descritas en la presente.

Tabla 9. Secuencias de aminoácidos de VL y VH de CD3.

SEQ ID NO.	SECUENCIA
SEQ ID NO: 45 CD3-1 VH Anti hu CD3 humanizado	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGK GLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNS LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 46 CD3-2 VH Anti hu CD3 humanizado	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 47 CD3-1 VL y CD3-2 VL Anti hu CD3 humanizado (CD3-1-2)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPG QAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEAD YYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

Las Tablas 10a y 10b proveen las secuencias de CDR para los clones scFv anti-CD3 VH scFv generados, utilizándose las designaciones de numeración de Kabat y AbM, respectivamente.

Tabla 10a. Secuencias de CD3 VH CDR en las que se utiliza la numeración de Kabat.

CD3 Clon #	CD3 VH CDR1	CD3 VH CDR2	CD3 VH CDR3
CD3-1	TYAMN SEQ ID NO: 48	RIRSKYNNYATYYADSVKG SEQ ID NO: 49	HGNFGNSYVSWFAY SEQ ID NO: 51
CD3-2	TYAMN SEQ ID NO: 48	RIRSKYNNYATYYADSVKD SEQ ID NO: 50	HGNFGNSYVSWFAY SEQ ID NO: 51

Tabla 10b. Secuencias de CD3 VH CDR en las que se utiliza la numeración de AbM.

CD3 Clon #	CD3 VH CDR1	CD3 VH CDR2	CD3 VH CDR3
CD3-1	GFTFSTYAMN SEQ ID NO: 52	RIRSKYNNYATY SEQ ID NO: 54	HGNFGNSYVSWFAY SEQ ID NO: 51
CD3-2	GFTFNTYAMN SEQ ID NO: 53	RIRSKYNNYATY SEQ ID NO: 54	HGNFGNSYVSWFAY SEQ ID NO: 51

La Tabla 10c provee las secuencias de CDR para los clones scFv anti-CD3 VL scFv generados.

Tabla 10c. Secuencias de CD3-1 y CD3-2 VL CDR en las que se utiliza la numeración de Kabat/AbM.

CD3 Clon #	CD3 VL CDR1	CD3 VL CDR2	CD3 VL CDR3
CD3-1 y CD3-2	RSSTGAVTTSNYAN SEQ ID NO: 55	GTNKRAP SEQ ID NO: 56	ALWYSNLWV SEQ ID NO: 57

Ejemplo 2

Construcción de un CD3 LP-DART anti-P-cadherina/antihumano

Unas proteínas DART CD3 anti-P-cadherina/antihumano fueron ampliadas mediante PCR de manera tal que cada proteína DART contenía un sitio de clonación de enzima de restricción en cada extremo para clonar en el vector de expresión de mamífero, véanse la Tabla 11 y las Figuras 33A y 33B.

Tabla 11. Proteínas DART CD3 anti-P-cadherina/antihumano.

DART	SECUENCIAS
35	P-CAD 35VL(SEQ ID NO: 5)-Ligador 1(SEQ ID NO: 68)-CD3-1 VH(SEQ ID NO: 45 ó 46), y CD3-1-2VL(SEQ ID NO: 47)-Ligador 1(SEQ ID NO: 69)-P-CAD 35VH(SEQ ID NO: 6)
153	P-CAD 153 VL (SEQ ID NO: 7)-Ligador 1 (SEQ ID NO: 68)-CD3 VH (SEQ ID NO: 45 ó 46), y CD3 VL (SEQ ID NO: 47)-Ligador 1 (SEQ ID NO: 69)-P-CAD 153 VH (SEQ ID NO: 8)
154	P-CAD 154 VL (SEQ ID NO: 9)-Ligador 1 (SEQ ID NO: 68)-CD3 VH (SEQ ID NO: 45 ó 46), y CD3 VL (SEQ ID NO: 47)-Ligador 1 (SEQ ID NO: 69)-P-CAD 153 VH (SEQ ID NO: 10)

Seguidamente, unos ácidos nucleicos que codifican las secuencias de proteína DART fueron fusionados a cada ácido nucleico que codifica los constructos Fc modificados, por ejemplo, la cadena Fc “botón” (SEQ ID NO: 63) y la cadena Fc “ojal” (SEQ ID NO: 64), cada uno de ellos conectado al terminal C del DART con un ligador de cisteína, tal como GCPPCP (SEQ ID NO: 73), GGTGGCPPCP (SEQ ID NO 74), GEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO 75) y GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO 76).

Después de la amplificación por PCR, los ácidos nucleicos tanto de DART como de cadena Fv fueron digeridos con sea BspEI y HindIII (sitio de clonación 5’ DART) sea EcoRI (sitio de clonación 3’ Fc). Los ADN digeridos fueron aislados por escisión a partir de geles de agarosa y subsiguiente purificación antes de ligacion en el vector de expresión digerido por HindIII-EcoRI durante 30 minutes a temperatura ambiente. Las ligaciones fueron a continuación transformadas en *E.coli* DH5α competente y cultivadas durante la noche a 37°C sobre placas de agarosa que contenían 100 µg/mL de carbenicilina. Se contaron las colonias, se las recogió y cultivó durante la noche en YT-caldo + 100 µg/mL de carbenicilina y ADN aislado, utilizándose métodos estándar. Todos los constructos de ADN fueron a continuación secuenciados en ambas cadenas antes de la expresión en células de mamífero. Unos pares de constructos complementarios fueron a continuación cotransfectados en cultivos en fase log 1L que contenían 1 millón de células/ml de células HEK 293. A las

24 horas después de la transfección, se añadió triptona hasta una concentración final de 0,75% y se permitió que las células se desarrollaran 5 días adicionales antes de su cosecha. Seguidamente se recolectaron los cultivos usados, se los sometió a centrifugación a efectos de remover los residuos de las células y seguidamente se los hizo pasar a través de un filtro de 20 µm. A continuación se llevó a cabo la purificación de las proteínas mediante técnicas conocidas en la especialidad. En las Figuras 1A y 1B se muestran ejemplos esquemáticos de LP-DARTS anti-P-cadherina/CD3 antihumano.

Ejemplo 3

Propiedades de ligación de proteínas P-cadherina scFv-Fc y DART

Las propiedades de ligación de los constructos P-cadherina scFv-Fc (P-cadherina VH y VL fusionados a una región IgG Fc humana) y de proteínas DART a los constructos proteína P-cadherina y a las células que expresan P-cadherina fueron analizadas mediante técnicas ELISA estándar. Los datos representados en la Tabla 12 demuestran que los constructos P-cadherina scFv derivados de fagos -Fc tienen una fuerte ligación a la P-cadherina humana recombinante y ninguna ligación detectable a la P-cadherina murina.

Tabla 12. Propiedades de ligación de P-cadherina scFv-Fc a los constructos proteína P-cadherina.

P-CAD Clon #	huP-cad-ECD EC50 (nM)	huP-cad-ECD biotinilado EC50(nM)	muP-cad-ECD EC50 (nM)
33 scFv-Fc	3,464	0,1012	NB
34 scFv-Fc	11,16	0,1943	NB
35 scFv-Fc	2,5	0,01762	NB
PF03732010	1,936	0,0188	2,333
Control Neg	NB	NB	NB

NB = no se detectó ligación

Las propiedades de ligación de la P-cadherina scFv-Fc a diversos tipos de células que expresan P-cadherina en el ELISA basado en células, se muestran en la Tabla 13. Los constructos P-cadherina scFv-Fc derivados de fagos demostraron una fuerte ligación a las células H1650 y a los tipos de célula SW480-huPcad y CHO-huPcad.

Tabla 13. Propiedades de ligación de P-cadherina scFv-Fc a células que expresan P-cadherina.

P-CAD Clon #	SW480-huPcad EC50 (nM)	H1650 EC50 (nM)	CHO-huPcad EC50(nM)	CHO genitor EC50 (nM)
33 scFv-Fc	0,4243	0,5669	0,4931	NB
34 scFv-Fc	0,4422	0,494	0,3938	NB
35 scFv-Fc	0,1734	0,1631	0,2761	NB
PF-03732010	0,1665	0,2092	0,3293	NB

P-CAD Clon #	SW480-huPcad EC50 (nM)	H1650 EC50 (nM)	CHO-huPcad EC50(nM)	CHO genitor EC50 (nM)
Control negativo	NB	NB	NB	NB

NB = no se detectó ligación

Como se muestra en la Tabla 14, las proteínas EK-DART anti-P-cadherina de la presente invención demostraron una fuerte ligación en formato ELISA a la P-cadherina expresada en la superficie celular en las células H1650 y a la P-cadherina-Fc humano recombinante pero ninguna ligación a otros miembros de la familia de las cadherinas, E-cadherina y VE-cadherina. El EK-DART es un constructo del dominio E/K espiral. El PF EK-DART es un control positivo que utiliza el VH y VL del mAb PF-03732010 clínico anti-P-cadherina como se describe en el Ejemplo 1. Todas las proteínas EK-DART en la Tabla 14 comprenden CD3-2.

Tabla 14. Propiedades de ligación de las proteínas P-cadherina EK-DART.

DART	Hu P-cadherina –Fc EC50 (nM)	E-cadherina-Fc EC50 (nM)	VE-cadherina-Fc EC50 (nM)	H1650 EC50 (nM)	CHO genitor EC50 (nM)
33 EK-DART	1,8	NB	NB	60,1	NB
34 EK-DART	2,85	NB	NB	67,95	NB
35 EK-DART	1,92	NB	NB	24,87	NB
PF EK-DART	2,1	NB	NB	19,69	NB
20 EK-DART	12,3	NB	NB	~114,7	NB
30 EK-DART	3,68	NB	NB	141,9	NB
Control negativo EK-DART	NB	NB	NB	NB	NB

NB = no se detectó ligación

Ejemplo 4

Análisis de SPR (Surface Plasmon Resonance, resonancia de plasmón de superficie) de proteínas DART

La afinidad de ligación de las proteínas EK-DART a P-cadherina y CD3 fue analizada mediante SPR utilizándose un biosensor BIACORE® 3000 (GE Healthcare). Unos antígenos huCD3$_{\varepsilon\delta}$ y sea P-cadherina-Fc humano o P-cadherina-ECD humano/mono cynomolgus/murino fueron inmovilizados sobre el chip sensor CM-5 mediante el kit el acoplamiento de amina de acuerdo a lo recomendado por el fabricante. La Tabla 15 muestra la afinidad de ligación de las proteínas EK-DART derivadas de fagos vs ECD de P-cadherina de mono cynomolgus ("cyno"), y la Tabla 16 muestra la afinidad de ligación de las proteínas EK-DART derivados de fagos vs. proteína CD3 humano soluble. Todas las proteínas EK-DART en las Tablas 15 y 16 comprenden CD3-2.

Tabla 15. Afinidad de ligación de proteínas EK-DART vs. P-cadherina de cyno ECD.

DART	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (nM)
33 EK-DART	1,15E+06	5,78E-02	46,4
34 EK-DART	7,05E+05	8,33E-02	129,3

35 EK-DART	3,18E+05	1,38E-02	43,4
PF EK-DART	2,11E+05	2,51E-03	11,90
20 EK-DART	3,46E+06	7,04E-03	2,03
30 EK-DART	4,72E+06	6,48E-03	1,37

Tabla 16. Afinidad de ligación de las proteínas EK-DART vs. CD3 humano soluble.

DART	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (nM)
33 EK-DART	2,28E+05	4,03E-03	17,7
34 EK-DART	1,95E+05	4,45E-03	22,8
35 EK-DART	1,89E+05	4,47E-03	23,6
PF EK-DART	4,11E+05	3,95E-03	9,61
20 EK-DART	9,79E+05	6,09E-03	5,19
30 EK-DART	3,53E+05	4,57E-03	13,6

En la Tabla 17, los datos de Biacore demuestran la afinidad de ligación de proteínas EK-DART optimizadas, con CD3-2, a P-cadherina de cyno ECD en comparación con el 35 EK-DART genitor con CD3-2. Todas las proteínas EK-DART en la Tabla 17 comprenden CD3-2.

Tabla 17. Afinidad de ligación de las proteínas EK-DART vs. P-cadherina de cyno ECD.

DART	ka (1/Ms)	kd(1/s)	KD (pM)
35 EK-DART	6,14E+05	2,15E-02	35050 ± 2950
153 EK-DART	7,32E+05	1,72E-05	231,5 ± 17,5
154 EK-DART	1,04E+06	3,90E-03	3930,0 ± 910
165 EK-DART	8,34E+05	3,09E-04	370,0 ± 87
177 EK-DART	8,02E+05	3,83E-04	483,0 ± 82
178 EK-DART	1,67E+05	2,16E-04	1310,0 ± 140
179 EK-DART	1,11E+06	4,58E-03	4165,0 ± 255
180 EK-DART	7,71E+05	7,44E-04	965,5 ± 19,5

En la Tabla 18, los datos de Biacore demuestran la afinidad de ligación del 35 EK-DART genitor y de las proteínas EK-DART optimizadas con respecto al $CD3_{\delta\varepsilon}$ soluble. Todas las proteínas EK-DART en la Tabla 18 comprenden CD3-2.

Tabla 18. Afinidad de ligación de las proteínas EK-DART vs. CD3 humano soluble.

DART	ka (1/Ms)	kd(1/s)	KD (nM)
35 EK-DART	1,89E+05	4,47E-03	23,6
153 EK-DART	4,03E+05	6,31E-03	15,65 ± 1,75
154 EK-DART	4,56E+05	7,68E-03	17,10 ± 0,90
165 EK-DART	2,78E+05	4,17E-03	14,90 ± 2,80
177 EK-DART	2,53E+05	4,43E-03	19,95 ± 6,55
178 EK-DART	2,30E+05	5,26E-03	23,10 ± 1,10
179 EK-DART	3,06E+05	6,41E-03	25,75 ± 9,25
180 EK-DART	7,06E+05	1,11E-02	15,9 ± 1,00

La afinidad de ligación versus P-cadherina de cyno a pH 7,4 de varios formatos

de DART se muestra en la Tabla 19. Las proteínas DART en los formatos VF, EK, LP, MP3- C-terminal y MP3- N-terminal con los dominios de unión de clon P-cadherina 153 VH y VL fueron comparadas. El 153 VF-DART demostró la afinidad de ligación más elevada con el coeficiente más rápido. Los KDs fueron similares a los de las proteínas 153 EK-DART y 153 LP-DART. Las proteínas 153 MP3-DART tuvieron afinidades de ligación ligeramente inferiores a la de P-cadherina de cyno como se indica mediante coeficientes más lentos. La actividad porcentual (Rmax) fue baja y similar para todas las proteínas 153 DART. Todas las proteínas DART en la Tabla 19 comprenden CD3-1, excepto el 153 EK-DART que comprende CD3-2.

Tabla 19 Afinidad de ligación de varios formatos de DART vs. P-cadherina de cyno.

DART	Ligando	ka (1/Ms)	kd(1/s)	t1/2 (min)	Rmax (RU)	*% Rmax	% Chi2/Rmax	KD (nM)
153 EK-DART CD3-2	P-cadherina de cyno	5,24E+05	2,11E-04	51,56	23,2	17,3	0,24	0,403
153 EK-DART	P-cadherina de cyno	5,17E+05	2,22E-04	48,98	14,0	14,9	0,33	0,430
						16,1	**AVG**	**0,417 ± 0,014**
153 VF-DART CD3-1	P-cadherina de cyno	7,22E+05	2,40E-04	45,35	22,66	15,0	0,32	0,332
153 VF-DART	P-cadherina de cyno	7,52E+05	2,29E-04	47,59	21,68	14,4	0,43	0,304
						14,7	**AVG**	**0,318 ± 0,014**
153 LP-DART	P-cadherina de cyno	2,93E+05	2,00E-04	54,36	36,6	12,1	0,16	0,683
153 LP-DART	P-cadherina de cyno	5,81E+05	2,09E-04	52,20	75,1	11,7	0,37	0,359
						11,9	**AVG**	**0,521 ± 0,162**
153-MP3 C-terminal DART	P-cadherina de cyno	6,80E+04	1,06E-04	102,38	129,1	19,5	0,15	1,56
153-MP3 C-terminal DART	P-cadherina de cyno	8,46E+04	1,79E-04	60,90	73,9	16,3	0,19	2,11
						17,9	**AVG**	**1,84 ± 0,28**
153-MP3 N-terminal DART	P-cadherina de cyno	1,22E+05	2,96E-04	36,82	72,4	16,1	1,34	2,43
153-MP3 N-terminal DART	P-cadherina de cyno	8,19E+04	2,28E-04	47,78	149,6	22,7	0,71	2,78
						19,4	**AVG**	**2.61 0,18**

La afinidad de ligación versus shCD3 (CD3 humano soluble) a pH 7,4 de diversos formatos de DART se muestra en la Tabla 20. Las proteínas DART en los formatos VF, EK, LP, MP3 C-terminal y MP3 N-terminal con los dominios de unión de VH y VL del clon #153 de P-cadherina fueron comparadas. El 153 VF-DART demostró

la afinidad de ligación más rápida y elevada al shCD3. Las proteínas 153 EK, LP y MP3 DART tuvieron afinidades similares al shCD3. La actividad porcentual (Rmax) para CD3 fue menor que la observada para P-cadherina de cyno. Todas las proteínas DART en la Tabla 20 comprenden CD3-1, excepto 153 EK-DART que comprende CD3-2.

Tabla 20. Afinidad de ligación de diversos formatos de DART vs. CD3 humano soluble.

DART	Ligando	ka (1/Ms)	Kd(1/s)	t1/2 (min)	Rmax (RU)	*% Rmax	% Chi2/Rmax	KD (nM)
153 EK-DART CD3-2	shCD3	2,77E+05	6,18E-03	1,76	80,94	55,5	0,09	22,3
153 EK-DART CD3-2	shCD3	2,83E+05	6,80E-03	1,60	62,68	31,1	0,04	24,0
						43,3	**AVG**	**23,15 ± 0,85**
153 VF-DART CD3-1	shCD3	1,13E+06	5,25E-03	2,07	90,92	69,1	0,85	4,65
153 VF-DART	shCD3	1,16E+06	5,55E-03	1,96	89,81	68,2	0,94	4,77
						68,7	**AVG**	**4,71 ± 0,06**
153 LP-DART	shCD3	4,18E+05	5,20E-03	2,09	170,3	64,7	1,07	12,4
153 LP-DART	shCD3	5,37E+05	5,72E-03	1,90	129,8	35,7	0,64	10,6
						50,2	**AVG**	**11,5 ± 0,9**
153 MP3-C-terminal DART	shCD3	4,20E+05	7,14E-03	1,52	133	35,3	0,29	17,0
153 MP3-C-terminal DART	shCD3	5,65E+05	7,19E-03	1,51	113,9	30,2	0,40	12,7
						32,8	**AVG**	**14,9 ± 2,2**
153 MP3-N-terminal DART	shCD3	4,74E+05	6,62E-03	1,65	120,7	32,3	0,65	14,0
153 MP3-N-terminal DART	shCD3	5,32E+05	5,82E-03	1,87	128,1	34,3	0,42	11,0
						33,3	**AVG**	**12,5 ± 1,5**

Ejemplo 5

Caracterización de las proteínas DART de P-cadherina

Se utilizó la DSC (Differential Scanning Calorimetry, Calorimetría Diferencial de Barrido) para caracterizar la estabilidad térmica de las proteínas EK-DART derivada de fagos. La Tabla 21 demuestra que las proteínas EK-DART de P-cadherina tenían perfiles térmicos favorables, con transiciones de Tm1 por arriba de los 65 °C. El análisis de agregación forzada demuestra la resistencia al estrés térmico presentada por las proteínas EK-DART de P-cadherina a 40°C. Todas las proteínas EK-DART en la Tabla 21 comprenden CD3-2.

Tabla 21. Análisis por DSC, de proteínas EK-DART de P-cadherina.

DART	DSC $T_{iniciación}$	DSC T_m1	Agregación forzada (% de agregados a 40C ON)	Reversibilidad del pH (% de reducción en monómero)
35 EK-DART	NA	67,15 ± 0,09	NA	NA
153 EK-DART	59,8	67,82 ± 0,02	41	6
154 EK-DART	63,06	68,40 ± 0,01	40	3
165 EK-DART	63,28	68,53 ± 0,01	39	<1
177 EK-DART	63,31	68,54 ± 0,01	39	1
178 EK-DART	61,96	66,92 ± 0,02	32	<1
179 EK-DART	61,56	67,15 ± 0,03	31	7
180 EK-DART	63,36	68,52 ± 0,01	32	1,5

En la Tabla 22a se muestran propiedades biofísicas adicionales de las proteínas EK-DART de P-cadherina madurados en afinidad. El valor teórico del pI de estas moléculas es de aproximadamente 8,5. Todas las proteínas EK-DART en la Tabla 22a comprenden CD3-2.

Tabla 22a. Propiedades biofísicas de las proteínas EK-DART de P-cadherina.

	Propiedades biofísicas calculadas para DART					
DART	**Contigo de residuos**	**Masa molar (g/mol)**	**pI**	**Carga a pH 7,00**	**$\varepsilon_{280}(M^{-1}cm^{-1})$**	**$\varepsilon_{280}(L\text{-}g^{-1}cm^{-1})$**
35 EK-DART	547	57.223,56	8,5	6,67	116.365	2,0335
153 EK-DART	547	57.179,54	8,62	7,67	116.365	2,0351
154 EK-DART	547	57.347,65	8,5	6,67	117.855	2,0551
165 EK-DART	547	57.314,63	8,5	6,67	117.855	2,0563
177 EK-DART	547	57.344,66	8,5	6,67	117.855	2,0552
178 EK-DART	547	57.250,59	8,5	6,67	116.365	2,0326
179 EK-DART	547	57.396,76	8,62	7,67	121.865	2,1232
180 EK-DART	547	57.330,63	8,5	6,67	117.855	2,0557

La Tabla 22b muestra la caracterización funcional de las proteínas VF-DART de P-cadherina maduradas en afinidad. Los datos de dos tipos de ensayos sobre linfocitos T citotóxicos (CTL, cytotoxic T lymphocyte) muestran una citotoxicidad conservada de un diacuerpo heterodimérico biespecífico sin E-K espirales. La afinidad más elevada con respecto a los ligandos correspondió a una mayor potencia en CTL, como pudo observarse en los EK-DART. Todas las proteínas VF-DART en la Tabla 22b comprenden CD3-1.

Tabla 22b. Caracterización funcional de proteínas VF-DART de P-cadherina.

DART	**Afinidad Biacore P-CAD Cyno monomérico ECD (nM)**	**Afinidad Biacore CD3 soluble (nM)**	**DU145 CTL (LDH) EC50 (nM)**	**HCT116 CTL (Luc) EC50 (nM)**
153 VF-DART	0,31	4,71	0,0004	0,0005
154 VF-DART	2,85	3,69	0,0024	0,008
35 VF-DART	NT	NT	0,012	,041

La Tabla 22c contiene datos de la caracterización biofísica de proteínas VF-DART de P-cadherina maduradas en afinidad. El análisis de las proteínas VF-DART indicó que no se detectó un incremento significativo en la agregación hasta los 65°C. Los datos sugirieron que el formato de VF-DART mejoró el perfil de agregación forzado a bajas temperaturas sin incidir sobre el Tm1. Los datos de LC/MS indicaron una formación correcta de heterodímero después de la expresión y purificación. Todas las proteínas VF-DART en la Tabla 22c comprenden CD3-1.

Tabla 22c. Datos de caracterización biofísica de proteínas VD-DART de P-cadherina.

DART	DSC Tm1	Agregación forzada	Sensibilidad al pH - % de incremento en la agregación	Observaciones de espectrometría de masas (Recolección final)	pI de electroforesis capilar y observaciones
153 VF-DART	69,82	Incremento en HMW >55C O/N; perfil similar al del mAb clínico	0	>99% correcto	8,18
154 VF-DART	70,08	Incremento en HMW >55C O/N; perfil similar al del mAb clínico	0	>99% correcto	NT
35 VF-DART	68,68	Incremento en HMW >55C O/N; perfil similar al del mAb clínico	0	>99% correcto	NT

Ejemplo 6

Caracterización de proteínas LP-DART de P-cadherina

La Tabla 23 resumen diversos datos biofísicos funcionales para ocho constructos LP-DART de P-cadherina diferentes (#1-#8) generados mediante el clon genitor P-CAD 35 y CD3-2.

Por ejemplo, la primera cadena polipeptídica (1) de LP-DART #1 tiene la siguiente designación: CD3 VL x P-CAD 35 VH-botón, donde el CD3 VL se refiere a la región de vinculación VL del anticuerpo anti-CD3-2 de la SEQ ID NO: 47, P-CAD 35 VH se refiere a la región de vinculación VH del clon 35 de anticuerpo anti-P-cadherina de la SEQ ID NO: 6, y “botón” se refiere a la cadena botón de Fc de la SEQ ID NO: 63. La tercera cadena polipeptídica (2) de LP-DART #1 tiene la designación: P-CAD 35VL x CD3VH-ojal, donde el P-CAD 35VL se refiere a la región de vinculación VL del clon 35 del anticuerpo anti-P-cadherina de la SEQ ID NO: 5, CD3 VH se refiere a la región de vinculación VH del anticuerpo anti-CD3-2 de la SEQ ID NO: 46, y “ojal” se refiere a la cadena ojal de Fc de la SEQ ID NO: 64. Se analizaron varios ligador de cisteína (Ligador 2) con una bisagra IgG1 truncada que tiene la secuencia CPPCP (SEQ ID NO 60) y por lo menos un residuo glicina. Los constructos LP-DART #1-#8 fueron comparados con el 35 EK-DART genitor.

Los datos demostraron un ligador más breve (Ligador 2) entre la porción de DART y el dominio Fc se correlacionaba con una mayor afinidad a cada ligando y a una mayor potencia en el ensayo CTL. Esto subrayó que un ligador más corto (Ligador 2) impidió que el dominio Fc interfiriese con los sitios de ligación del ligando sobre la porción de DART. Los datos también sugirieron que la orientación: CD3 VL x P-CAD 35 VH-ojal y P-CAD 35 VL x CD3 VH-botón, como se muestra en la Figura LP- DART #5 a LP- DART #8, era óptima para la generación de LP-DART.

Tabla 23. Datos funcionales y biofísicos para las proteínas LP-DART de P-cadherina.

	LP-DART #1	LP-DART #2	LP-DART #3	LP-DART #4	LP-DART #5	LP-DART #6	LP-DART #7	LP-DART #8	35 EK-DART
Primera cadena	CD3VLx P-CAD 35VH-botón	CD3VLx P-CAD 35VH-botón	CD3VLx P-CAD 35VH-botón	CD3VLx P-CAD 35VH-botón	CD3VLx P-CAD 35VH-ojal	CD3VLx P-CAD 35VH-ojal	CD3VLx P-CAD 35VH-ojal	CD3VLx P-CAD 35VH-ojal	
Segunda cadena	P-CAD 35VLx CD3VH-ojal	P-CAD 35VLx CD3VH-ojal	P-CAD 35VLx CD3VH-ojal	P-CAD 35VLx CD3VH-ojal	P-CAD 35VLx CD3VH-botón	P-CAD 35VLx CD3VH-botón	P-CAD 35VLx CD3VH-botón	P-CAD 35VLx CD3VH-botón	
Ligador (Ligador 2)	GCPPCP **SEQ ID NO: 73**	GGTGG CPPCP **SEQ ID NO:74**	GEPKSS DKTHTC PPCP **SEQ ID NO:75**	GGTGG GEPKSS DKTHTC PPCP **SEQ ID NO:76**	GCPPCP **SEQ ID NO: 73**	GGTGG CPPCP **SEQ ID NO:74**	GEPKSS DKTHTC PPCP **SEQ ID NO:75**	GGTGG GEPKSS DKTHTC PPCP **SEQ ID NO:76**	
Rendimiento de la captura (mg/L)	24	23	35	28	20	24	27	34	5
% Agg después de captura	40%	37%	33%	39%	33%	40%	40%	45%	7%
Cyno-Pcad KD (nM)	108,0	73,5	85,7	128,0	62,1	86,6	96,6	104,0	42,8
shCD3 KD (nM)	32,9	47,9	47,2	55,1	30,2	42,1	49,1	55,6	17,1
Citotoxicidad de las células T (nM)	0,79	0,92	1,60	2,45	0,74	1,29	2,85	2,27	0,33

La Tabla 24 muestra la caracterización funcional *in vitro* de varias proteínas LP-DART de P-cadherina que llevan incorporadas las regiones de ligación LVH y Vl de P-cadherina de elevada afinidad como también los dominios de ligación VH y VH anti-CD3 de elevada afinidad. Los datos demuestran que una actividad incrementada se correlaciona con una potencia de CTL incrementada; de manera similar a la correlación observada para los formatos VF-DART y EK-DART de P-cadherina. Todas las proteínas LP-DART en la Tabla 24 comprenden CD3-1. Lo mismo que con los clones genitores 33, 34 y 35, el 1253 LP-DART no se ligó a la P-cadherina murina.

Tabla 24. Caracterización funcional de proteínas LP-DART de P-cadherina.

DART	Afinidad según Biacore P-cadherina de cyno ECD monomérico ECD (nM)	Afinidad según Biacore de P-cadherina murino ECD	Afinidad de Biacore a CD3 soluble (nM)	DU145 CTL (LDH) EC50 (nM)	HCT116 CTL (Luc) EC50 (nM)
153 LP-DART	0,521	NB	11,5	0,0006	0,0004
154 LP-DART	5,5	NT	7,18	0,0017	0,0072
35 LP-DART	NT	NT	NT	0,0073	0,107

NT = no se ensayó; no hubo ligacion

La Tabla 25 muestra la caracterización biofísica de varias proteínas LP-DART de P-cadherina. El DSC de las proteínas LP-DART de P-cadherina mostró un valor de Tm1 similar al obtenido con las proteínas EK-DART y VF-DART de P-cadherina. El

análisis de la agregación forzada sugirió una estabilidad mejorada a temperaturas más bajas con respecto al formato EK-DART de P-cadherina y un perfil general similar al del mAbs clínico. Los datos de LC/MS indicaron una adecuada formación de heterodímero después de expresión y purificación. Todas las proteínas LP-DART en la Tabla 25 comprenden CD3-1.

Tabla 25. Caracterización biofísica de las proteínas LP-DART de P-cadherina.

Constructo	DSC Tm1	Agregación forzada	sensibilidad pH - % Incremento en Agregación	Observaciones en espectrometría de masas (recolección final)	pI de electroforesis capilar y observaciones
153 LP-DART	68,91	Incremento en HMW >55C O/N; perfil similar al del mAb clínico	0	>99% correcto	8,26, Shouldering
154 LP-DART	68,63	Incremento en HMW >55C O/N; perfil similar al del mAb clínico	0	>99% correcto	NT
35 LP-DART	68,39	Incremento en HMW >55C O/N; perfil similar al del mAb clínico	0	>99% correcto	NT

NT = no se ensayó

La Tabla 26 provee los datos SPR de Biacore de las proteínas LP-DART, 153 LP-DART y 154 LP-DART, de P-cadherina, que se ligan a P-cadherina de cyno ECD y $CD3_{\delta\varepsilon}$. Los datos demuestran que hubo una disminución menor en la afinidad con respecto a cada ligando en comparación con la afinidad del EK-DART correspondiente. Todas las proteínas LP-DART en la Tabla 26 comprenden CD3-1.

Tabla 26. Propiedades de ligación de las proteínas P-cadherina LP-DART cyno-P-cadherina y CD3 soluble

DART	Ligando	ka (1/Ms)	kd(1/s)	t1/2 (min)	Rmax (RU)	*% Rmax	% Chi2/Rmax	KD (nM)
153 LP-DART	P-cadherina de cyno	2,93E+05	2,00E-04	54,36	36,6	12,1	0,16	0,683
		5,81E+05	2,09E-04	52,20	75,1	11,7	0,37	0,359
						11,9	**AVG**	**0,521 ± 0,162**
154 LP-DART	P-cadherina de cyno	6,07E+05	3,32E-03	3,27	46,29	32,3	0,49	5,47
		6,20E+05	3,43E-03	3,18	46,38	32,4	0,56	5,53
						32,35	**AVG**	**5,50 ± 0,03**
153 LP-DART	shCD3	4,18E+05	5,20E-03	2,09	170,3	64,7	1,07	12,4
		5,37E+05	5,72E-03	1,90	129,8	35,7	0,64	10,6
						50,2	**AVG**	**11,5 ± 0,9**
154 LP-DART	shCD3	6,13E+05	4,42E-03	2,47	476,7	42,5	5,73	7,20
		6,37E+05	4,56E-03	2,39	475,0	42,3	5,41	7,16
						42,4	**AVG**	**7,18 ± 0,02**

Ejemplo 7

Cuantificación de la expresión de P-cadherina

A. Cuantificación de la expresión de P-cadherina en líneas de células de cáncer diseñadas para expresar luciferasa para estudios in vitro

Se llevaron a cabo experimentos citometría de flujo a efectos de evaluar la ligación de mAB (PF-03732010) anti-P-cadherina para determinar el nivel relativo de la expresión de P-cadherina en la superficie de células endógenas a través de un panel de 10 líneas de células de cáncer. Todas las línea de células para los ensayos in vitro fueron diseñadas para expresar luciferasa. Se recolectaron líneas de células de tumor que demuestran un intervalo de expresión del receptor de P-cadherina como se describió para la ligación de FACS de saturación. $2{,}5x10^5$ células por muestra fueron transferidas a placas de polipropileno de 96 cavidades de fondo redondo. Las células fueron teñidas con 5 µg/ml y 10 µg/ml de mAB (PF-03732010) de P-cadherina etiquetado con ficoeritrina (PE) conjugado con una relación de 1:1 mAb a PE (eBioscience) o con PE conjugado con un mAb de IgG1 de ratón de control (Biolegend) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas y resuspendidas con tampón FACS más 10 ng/ml de yoduro de propidio ante de la adquisición, utilizándose LSRII con software FACS Diva. Unas perlas de QuantiBRITE PE (BD Pharmingen) fueron reconstituidas utilizándose 0,5 mL de tampón FACS y se adquirió utilizando el LSRII con los mismos ajustes de voltaje que las muestras de células de tumor. Se utilizó la intensidad fluorescente geométrica media de PE tanto de las perlas como de las células tumorales para calcular la cantidad de anticuerpos etiquetados con PE unidos por célula (ABC) siguiéndose el protocolo prescrito por el fabricante para el kit QuantiBRITE PE Bead Kit. Se determinó una curva de regresión lineal ajustada entre la densidad del receptor y el EC50 de la citotoxicidad mediante la graficación del valor de Log_{10} de la densidad promedia del receptor determinada mediante el ensayo Quantibrite a 5 µg/mL y 10 µg/mL de mAb de anti-P-cadherina etiquetado con PE para cada línea de células tumorales versus el valor de Log_{10} de la citotoxicidad promedia *in vitro* EC50 para dicha misma línea de células tumorales apuntadas, para lo cual se utilizó el software GraphPad Prism 5,0.

Se observó un amplio intervalo de expresión de P-cadherina sobre la superficie de las células a través del panel y del mAb anti-P-cadherina ligado a líneas de células que fueran derivadas de una variedad de tipos de cáncer, lo que incluye cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer colorrectal, como se muestra en la Tabla 27. En cambio, el mAB de control no mostró una ligación apreciable. MFI = intensidad media de la fluorescencia (Mean fluorescence intensity); ABC = anticuerpos ligados por célula.

Tabla 27. Nivel de expresión de P-cadherina sobre superficie celular endógena sobre las líneas de células de cáncer que expresan luciferasa

Línea de células	Tipo de tumor	MFI, mAb de control	MFI, P-cadherina mAb	ABC, P-cadherina mAb
H1650_Luc	Cáncer de pulmón	254	7,958	37,582
HCT116_Luc	Cáncer colorrectal	229	5,661	26,421
BT20_Luc	Cáncer de mama	225	5,235	24,349
SUM149_Luc	Cáncer de mama	213	3,717	16,982
H322_Luc	Cáncer de pulmón	242	3,233	16,576
H1975_Luc	Cáncer de pulmón	373	3,155	15,429
LoVo_Luc	Cáncer colorrectal	175	1,389	5,805
SW480_Luc	Cáncer colorrectal	151	1,256	5,304
HT29_Luc	Cáncer colorrectal	282	787	2,421
Ls174T_Luc	Cáncer colorrectal	94	290	929
Colo205_Luc	Cáncer colorrectal	173	357	874
SW620_Luc	Cáncer colorrectal	125	276	715

B. Cuantificación de la expresión de P-cadherina sobre líneas de células de cáncer para estudios in vivo

Se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo a efectos de evaluar la ligación de mAB (PF-03732010) anti-P-cadherina para determinar el nivel relativo de la expresión de P-cadherina en la superficie de células endógenas a través de un panel de líneas de células de cáncer. Se recolectaron líneas de células de tumor que demuestran un intervalo de expresión del receptor de P-cadherina como se describió para la ligación de FACS de saturación. $2{,}5x10^5$ células por muestra fueron transferidas a placas de polipropileno de 96 cavidades de fondo redondo. Las células fueron teñidas con 5 µg/ml y 10 µg/ml de mAB de P-cadherina antihumano etiquetado con ficoeritrina (PE) conjugado con una relación de 1:1 mAb a PE (eBioscience) o con 7,5 µg/mL de PE conjugado con un mAb de IgG1 de ratón de control (Biolegend) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas y resuspendidas con tampón FACS más 10 ng/ml de yoduro de propidio ante de la adquisición, utilizándose LSRII con software FACS Diva. Unas perlas de QuantiBRITE PE (BD Pharmingen) fueron reconstituidas utilizándose 0,5 mL de tampón FACS y se adquirió utilizando el LSRII con los mismos ajustes de voltaje que las muestras de células de tumor. Se utilizó la intensidad fluorescente geométrica media de PE tanto de las perlas como de las células tumorales para calcular la cantidad de anticuerpos etiquetados con PE unidos por célula (ABC) siguiéndose el protocolo prescrito por el fabricante para el kit QuantiBRITE PE Bead Kit.

Se observó un amplio intervalo de expresión de P-cadherina sobre la superficie de las células sobre las líneas de células derivadas de cáncer colorrectal y cáncer de mama, y se categorizó de manera acorde: HCT116 > SUM149 > SW480 > Ls174T > SW620, como se muestra en la Tabla 28. En cambio, el mAB isótopo de control no mostró una ligación apreciable a ninguna de las líneas de células.

Tabla 28. Nivel de expresión de P-cadherina sobre la superficie de las células

endocrinas, en líneas de células de cáncer.

Línea de células	Tipo de tumor	MFI, Control mAb	MFI, P-cadherina mAb	ABC, P-cadherina mAb
HCT116	Cáncer colorrectal	239	8,033	43,801
SW480	Cáncer colorrectal	171	2,468	12,665
Ls174T	Cáncer colorrectal	222	986	4,160
SW620	Cáncer colorrectal	88	297	1,117
SUM149	Cáncer de mama	68	2,872	15,426

Ejemplo 8

Ensayos de citotoxicidad *in vivo*

A. Ensayos CTL (linfocitos T citotóxicos) sobre EK- DART

Se seleccionaron sistemáticamente proteínas EK-DART que muestran una fuerte ligación recombinante de P-cadherina/CD3 como también una fuerte señal de ligación (>3x el segundo plano o EC50 ≈ PF03732010-DART) en ensayos de eliminación dirigida a células T, como anteriormente descrito (Moore et al., Blood, 117(17): 4542-4551, 2011). La Tabla 29 demuestra una citotoxicidad efectiva dirigida para las proteínas EK-DART de P-cadherina EK-DART de la presente invención. En la presencia de PBMC humano con una relación E:T de 30:1, unas células CHO diseñadas para sobreexpresar P-cadherina humana y líneas de células cáncer que de manera endógena expresan elevados niveles de P-cadherina (H1650) fueron ambas lisadas por las proteínas EK-DART después de 24 horas de incubación, medidas mediante un ensayo de liberación de LDH. Extendiendo el tiempo de incubación a 40 horas se incrementó más aun la potencia de la eliminación de células, como se anticipa por el mecanismo de acción de la eliminación redirigida de las células T que con las moléculas EK-DART de P-cadherina. En cambio no se observó ninguna eliminación sobre la línea de células CHO genitoras como se prevé sobre la base de la falta de expresión de P-cadherina. Todas las proteínas EK-DART en la Tabla 29 comprenden CD3-2.

Tabla 29. Citotoxicidad dirigida a las células T para las proteínas EK-DART de P-cadherina.

DART	CHO-CDh3 (24h) EC50 (nM)	H1650 (24h) EC50 (nM)	H1650 (40h) EC50 (nM)
33 EK-DART	0,309	4,104	1,124
34 EK-DART	0,7365	5,604	1,6
35 EK-DART	0,0398	0,5014	0,0532
PF EK-DART	0,0284	0,4038	0,505
20 EK-DART	168,64	36,44	NT
30 EK-DART	NR	NR	NT

La citotoxicidad dirigida contra las células T, de las proteínas EK-DART de P-cadherina optimizadas contra las células tumorales que expresan P-cadherina

humano y un constructo informante luciferasa constitutivamente expresado, se muestra en la Tabla 30. Todas las proteínas EK-DART consignadas en la Tabla 30 comprenden CD3-2.

Tabla 30. Citotoxicidad dirigida contra las células T, para las proteínas EK-DART de P-cadherina.

DART	HCT116 Luc 48hr 10:1 D43905 EC50 nM	H1650 LDH 24hr 30:1 D41183 EC50 nM
153 EK-DART	0,0005	0,0008
154 EK-DART	0,0166	0,0107
165 EK-DART	0,0015	0,0011
177 EK-DART	0,0007	0,0011
178 EK-DART	0,0018	0,0008
179 EK-DART	0,0432	0,0178
180 EK-DART	0,0018	0,0016
35 EK-DART	0,2051	0,1016

B. Ensayos de CTL (linfocitos T citotóxicos) con LP-DART

Se evaluó la eliminación mediada de células por 153 LP-DART mediante el ensayo CTL. Unas células CHO genitoras y de CHO P-cadherina con una relación 10:1 entre células efectoras (células T) por células objetivo (células de CHO) fueron sometidas incubación con células CD3+ T en la presencia de concentraciones crecientes de 153 LP-DART. La viabilidad de las células fue medida después de 48 horas y se determinó por cálculo que la concentración efectiva semimáxima (EC50) es de 0,41 pM. Los resultados mostraron que el 153 LP-DART demostró una eliminación potente sobre las células CHO P-cadherina; sin embargo, no se detectó una actividad detectable arriba del control negativo sobre las células CHO genitoras. Por ello, la actividad CTL dependía de la expresión de la P-cadherina.

Se evaluó la eliminación tumoral mediada por 153 LP-DART mediante un ensayo de CTL. Se analizó la citotoxicidad, dirigida contra las células T, por la proteína 153 LP-DART optimizada contra células tumorales que expresan P-cadherina humana. Unas células CD3+ T fueron sometidas a incubación con un panel de líneas de células de cáncer con una relación 3:1 entre las células T efectoras y las células de cáncer objetivo en la presencia de concentraciones crecientes de 153 LP-DART. Se midió la viabilidad de las células después de 72 horas y se calculó una concentración efectiva semimáxima (EC50) para cada línea de células de cáncer, como se como se muestra en la Tabla 31**.** Los datos demuestran que el 153 LP-DART media una potente actividad antitumoral en los modelos de cáncer. EC50 = concentración efectiva semimáxima; S.D. = desviación estándar; pM = picomolar; NA = Sin actividad.

Tabla 31 Actividad citotóxica de los linfocitos T de 153 LP-DART en línea de células

de cáncer que expresan luciferasa.

Línea de células	Tipo de tumor	EC50 ± S.D. (pM)
H1650_Luc	Cáncer de pulmón	4,24 ± 0,66
HCT116_Luc	Cáncer colorrectal	5,6 ± 3,61
BT20v_Luc	Cáncer de mama	4,72 ± 2,43
SUM149_Luc	Cáncer de mama	0,35 ± 0,10
H1975_Luc	Cáncer de pulmón	0,96 ± 0,31
H322_Luc	Cáncer de pulmón	5,78 ± 3,09
LoVo_Luc	Cáncer colorrectal	1,65 ± 0,91
SW480_Luc	Cáncer colorrectal	53,37 ± 30,73
HT29_Luc	Cáncer colorrectal	41,19 ± 22,17
Ls174T_Luc	Cáncer colorrectal	1439,07 ± 2462,25
Colo205_Luc	Cáncer colorrectal	191,28 ± 203,58
SW620_Luc	Cáncer colorrectal	NA

C. Comparación de la actividad CTL sobre los niveles de expresión de P-cadherina sobre la superficie de las células

Se recolectaron líneas de células de tumor del Cap. A que demuestran un intervalo de expresión del receptor de P-cadherina y $2{,}5x10^5$ células por muestra fueron transferidas a placas de polipropileno de 96 cavidades de fondo redondo. Las células fueron teñidas con 5 µg/ml y 10 µg/ml de mAB (Phizer -03732010) de P-cadherina humana etiquetada con ficoeritrina (PE) a razón de 5 µg/ml y de 10 µg/ml conjugado con una relación de 1:1 mAb a PE (eBioscience) o con PE conjugado con un mAb de IgG1 de ratón de control (Biolegend) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas y resuspendidas con tampón FACS más 10 ng/ml de yoduro de propidio ante de la adquisición, utilizándose LSRII con software FACS Diva. Unas perlas de QuantiBRITE PE (BD Pharmingen) fueron reconstituidas utilizando 0,5mL de tampón FACS y se adquirió utilizando el LSRII con los mismos ajustes de voltaje que las muestras de células de tumor. Se utilizó la intensidad fluorescente geométrica media de PE tanto de las perlas como de las células tumorales para calcular la cantidad de anticuerpos etiquetados con PE unidos por célula (ABC, antibodies bound per cell) siguiéndose el protocolo prescrito por el fabricante para el kit QuantiBRITE PE Bead Kit.

Se determinó una curva de regresión lineal ajustada entre la densidad del receptor y el EC50 de la citotoxicidad mediante la graficación del valor de Log_{10} de la densidad promedia del receptor determinada mediante el ensayo Quantibrite a 5 µg/mL y 10 µg/mL de mAb de anti-P-cadherina etiquetado con PE para cada línea de células tumorales versus el valor de Log_{10} de la citotoxicidad promedia *in vitro* EC50 para dicha misma línea de células tumorales apuntadas, para lo cual se utilizó el software GraphPad Prism 5,0. Como se muestra en la Figura 8, hubo una relación

significativa entre los EC50 más bajos y una ligación incrementada de mAb anti-P-cadherina a la superficie de las células, valor de P =0,0127. Esto indica que la actividad del CTL estaba correlacionada con los niveles de expresión de la P-cadherina.

Ejemplo 9

Estudios de xenoinjertos de reconstitución de PBMC humano

Se ensayaron *in vivo* diversas proteínas DART que demuestran una potente citotoxicidad dirigida contra las células T (< 10 ng/mL EC50) en experimentos de reconstitución de xenoinjertos in *vivo* como se describe en lo que sigue.

A. Aislamiento de PBMCs y de células T a partir de sangre humana entera

Se aislaron PBMC de donantes humanos saludables de sangre entera para lo cual se utilizó la centrifugación de gradiente por Ficoll. En pocas palabras, una cantidad de sangre entera fue diluida 1:1 con PBS estéril. Se dispusieron 35 mL de la sangre diluida en capas sobre 15 mL de FICOLL-PAQUE™ Plus en tubos de 50 mL, y los tubos fueron sometidos a centrifugación a 1400 rpm durante 20 min con el freno retirado. La capa leucocitaria entre las dos fases fue recolectada en un tubo de 50 ml y lavada con 45 mL de PBS mediante la centrifugación de los tubos para 600 x g (1.620 rpm) durante 5 min. El material sobrenadante fue descartado y se lavaron las pellas de las células una vez con PBS y se determinó el conteo de células viables mediante exclusión con tinte Trypan Blue. Los PBMCs fueron resuspendidos hasta una concentración final de $2{,}5 \times 10^6$ células/mL en medio completo RPMI 1640, FBS al 10%, glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, penicilina/estreptomicina 100 µ/100µ/mL (P/S).

B. Aislamiento y activación de las células T

Se aislaron células T humanas de sangre entera heparinizada en base a las instrucciones del fabricante provistas en el kit para la aislación de células T de RosettaSep. Las células T purificadas fueron subsiguientemente activadas mediante la exposición de las células a anticuerpos anti-CD3 (OKT-3; 1 µg/mL) y a anticuerpos anti-CD28 (66 µg/mL) durante un intervalo de 48 horas. Después de la estimulación, las células fueron cultivadas en un medio RPMI 1640 con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina al 1% en la presencia de IL-2 (7,6 ng/mL) durante hasta tres semanas.

C. Modelo de tumor

Se combinaron células T y células tumorales humanas (HCT116, Du145 o H1650) en una relación de 1:5 (1×10^6 y 5×10^6, respectivamente) y suspendidas en 200 µL de solución salina estéril y fueron inyectadas por vía subcutánea (SC) en el día

de estudio 0 (SD0). Diversas proteínas EK-DART (CD3-2), LP-DART (CD3-1) o un DART de control, de P-cadherina (CD3-2), junto con un control, fueron administradas por vía intravenosa (IV) en la vena caudal a razón de 100 µL/kg a los días SD0, 1, 2, y 3. Cada grupo de tratamiento contenía ocho animales.

P-CAD 177 EK-DART en un modelo de tumor HCT116: P-CAD 177 EK-DART fue administrado con una dosis de 0,5, 0,2, 0,1 o 0,05 mg/kg a cuatro grupos de tratamiento y un vehículo de control (células HCT116 solamente implantadas + células T) se administró a un grupo de tratamiento (0 mg/kg).

P-CAD 153 EK-DART en un modelo de tumor HCT116: P-CAD 153 EK-DART se administró con una dosis de 0,5, 0,2, 0,1 o 0,05 mg/kg a 4 grupos de tratamiento y un vehículo de control (células HCT116 solamente implantadas + células T) se administró a un grupo de tratamiento (0 mg/kg).

P-CAD 154 EK-DART en un modelo de tumor HCT116: P-CAD 154 EK-DART se administró con una dosis de 0,5, 0,2, 0,1 o 0,05 mg/kg a cuatro grupos de tratamiento y un vehículo de control (células HCT116 solamente implantadas + células T) se administró a un grupo de tratamiento (0 mg/kg).

P-CAD 35 EK-DART en un modelo de tumor HCT116: P-CAD 35 EK-DART se administró con una dosis de 0,5, 0,2, 0,1 o 0,05 mg/kg a cuatro grupos de tratamiento y un vehículo de control (células HCT116 solamente implantadas + células T) se administró a un grupo de tratamiento (0 mg/kg).

P-CAD 153 LP-DART en un modelo de tumor HCT116: los grupos de tratamiento recibieron administraciones de P-CAD 153 LP-DART con una dosis de 0,5, 0,2, 0,1 o 0,05 mg/kg, o de un vehículo de control (células HCT116 solamente implantadas + células T).

P-CAD 153 LP-DART en un modelo de tumor HCT116: los grupos de tratamiento recibieron administraciones de P-CAD 153 LP-DART con una dosis de 100, 10, 1, 0,1, o 0,01 µg/kg, o de un vehículo de control (células HCT116 implantadas solamente), un vehículo de control (células HCT116 implantadas + células T) o un 4420-hXR32 LP-DART (100 µg/kg) de control.

P-CAD 153 LP-DART en un modelo de tumor Du145: los grupos de tratamiento recibieron administraciones de P-CAD 153 LP-DART con una dosis de 100, 10, 1, 0,1, o 0,01 µg/kg o de un vehículo de control (células Du145 implantadas solamente), un vehículo de control (células HCT116 implantadas + células T) o un 4420-hXR32 LP-DART (100 µg/kg) de control.

P-CAD 153 LP-DART en un modelo de tumor H1650: los grupos de tratamiento

recibieron administraciones de P-CAD 153 LP-DART con una dosis de 100, 10, 1, 0,1, o 0,01 µg/kg, o de un vehículo de control (células H1650 Implantadas solamente), un vehículo de control (células H1650 implantadas + células T) o un 4420-hXR32 LP-DART (100 µg/kg) de control.

C. Recolección de datos y análisis estadísticos

Peso de los animales: se registraron los pesos de los animales individuales dos veces por semana hasta completar el estudio, empezándose en el momento de la inyección de las células tumorales.

Condición de moribundo/mortalidad: los animales fueron observados dos veces por semana para establecer la condición general de moribundo y diariamente para establecer la mortalidad. Las muertes de los animales fueron evaluadas como relacionadas con el fármaco o como técnicos en base a factores que incluían una observación grosera y pérdida de peso; las muertes de los animales fueron registrados diariamente.

Volumen tumoral: los volúmenes tumorales individuales se registraron dos veces por semana. Se comenzó una semana después del implante del tumor y continuó hasta completar el estudio.

Volumen del tumor (mm^3) = ((longitud (mm) x $ancho^2$)/2)

Los animales que experimentaron muertas técnicas o relacionadas con el fármaco no fueron tenidos en cuenta para el cálculo de los datos.

Inhibición del crecimiento de los tumores: los valores de la inhibición del crecimiento de los tumores (TGI, inhibición del crecimiento de los tumores) fueron calculados para cada grupo que contenía animales tratados, utilizándose la siguiente fórmula:

$$1- \frac{\text{Volumen medio final del tumor (tratado)- Volumen medio inicial del tumor (tratado)}}{\text{Volumen medio final del tumor (de control)- Volumen medio Inicial del tumor (de control)}} \times 100$$

Los animales que experimentaron una respuesta parcial o completa, o los animales que experimentaron muertes técnicas o relacionadas con un fármaco, no fueron tenidos en cuenta en los cálculos de TGI. El criterio del National Cancer Institute para la actividad del compuesto es de: TGI>58% (Corbett *et al*. (2004) *Anticancer Drug Development Guide*; Totowa, NJ: Humana 99-123

Respuesta parcial/completa de los tumores: los ratones individuales que poseían tumores inferiores a 1 mm^3 en el Día 1 fueron clasificados como poseedores de una respuesta parcial (PR, partial response), y se determinó un valor porcentual de regresión del tumor (% TR, percent tumor regression) mediante la siguiente fórmula:

$$1- \frac{\text{Volumen final del tumor } (mm^3)}{\text{Volumen inicial del tumor } (mm^3)} \times 100\%$$

Los ratones individuales carentes de tumores palpables fueron clasificados como si experimentasen una respuesta completa (CR).

Estadísticas de los volúmenes de los tumores: se llevaron a cabo análisis estadísticos entre los grupos tratados y de control, mediante la comparación de los volúmenes de los tumores. Para estos análisis se utilizó un análisis de dos vías de varianza seguida por un postest de Bonferroni. Todos los análisis fueron llevados a cabo utilizando el software de GraphPad PRISM® (versión 5,02). Los datos de los pesos y de los tumores de los animales individuales que experimentaron muertes técnicas o relacionadas con el fármaco no fueron tenidos en cuenta en el análisis. Sin embargo, los datos de los tumores de los animales que presentaron respuestas parciales o completas fueron incluidos en estos cálculos.

D. Resultados del Modelo de Tumor HCT116

La línea de células HCT116 fue premezclada con células T activadas y fue implantada por vía subcutánea en ratones gamma knockout NOD/SCID (N = 8/grupo) en el día de estudio 0 (SD0) como se detalló en lo que precede. El tratamiento con las diversas proteínas EK-DART, LP-DART o DART de control, fue iniciado en el mismo día en que se implantó la mezcla de células de tumor/células T [(SD0)] y continuó posteriormente con inyecciones diarias durante tres días adicionales hasta un total de cuatro inyecciones diarias. Los animales fueron tratados con proteínas EK-DART, LP-DART de P-cadherina o con una proteína DART de control con cuatro niveles de dosis (0,5, 0,2, 0,1, y 0,05 mg/kg). Los resultados se muestran en las Figuras 9-14.

Los tumores HCT116 en el grupo tratado con vehículo (células HCT116 solamente o más células T), demuestran un perfil de creecimiento relativamente agresivo *in vivo*. En el día de estudio 20 (SD20), el volumen promedio de los tumores en el grupo tratado con vehículo era de aproximadamente 125 mm^3 y en el día de estudio 35 (SD35) los tumores habían alcanzado un volumen promedio de aproximadamente 450 mm^3. Al final del experimento, en el día de estudio 45 (SD45), los tumores habían alcanzado un volumen promedio de aproximadamente 750 mm^3. El crecimiento de los tumores de HCT116 fue inhibido de manera significativa con todos los niveles de dosis para la mayoría de las proteínas DART de P-cadherina ensayadas. Al final del experimento en el día SD45, el volumen promedio de los tumores variaba entre aproximadamente 100 y 0 mm^3 para todos los tratamientos excepto el 177 EK-DART que presentó un intervalo de aproximadamente 500 a 100

mm^3.

E. Resultados con Du145

La línea de células Du145 fue premezclada con células T activadas y fue implantada por vía subcutánea en ratones gamma knockout NOD/SCID (N = 8/grupo) en el día de estudio 0 (SD0) como se detalló en lo que precede. El tratamiento con 153 LP-DART fue iniciado en el mismo día en que se implantó la mezcla de células de tumor/células T [(SD0)] y continuó posteriormente con inyecciones diarias durante tres días adicionales durante un total de 4 inyecciones diarias. Los animales fueron tratados con 153 LP-DART con niveles de dosis (100, 10, 1, 0,1 y 0,01 µg/kg). Los resultados se muestran en la Figura 15.

Los tumores de Du145 en el grupo tratado con vehículo (células Du145 solamente o más células T), demostraron un perfil de crecimiento relativamente agresivo *in vivo*. El crecimiento de los tumores de Du145 fue inhibido de manera significativa con niveles de dosis de 100, 10 y 1 µg/kg de 153 LP-DART y al final del experimento (SD74), el volumen promedio de los tumores era de 0 mm^3. Con un nivel de dosis 0,1 µg/kg de 153 LP-DART, el crecimiento de los tumores de Du145 se había inhibido de manera significativa y al final del experimento (SD74) el volumen promedio de los tumores era de aproximadamente 500 mm^3.

F. Resultados con H1650

La línea de células H1650 fue premezclada con células T activadas y fue implantada por vía subcutánea en ratones gamma knockout NOD/SCID (N = 8/grupo) en el día de estudio 0 (SD0) como se detalló en lo que precede. El tratamiento con 153 LP-DART fue iniciado en el mismo día en que se implantó la mezcla de células de tumor/células T [(SD0)] y continuó posteriormente con inyecciones diarias durante 3 días adicionales durante un total de 4 inyecciones diarias. Los animales fueron tratados con 153 LP-DART con 5 niveles de dosis (100, 10, 1, 0,1 y 0,01 µg/kg). Los resultados se muestran en la Figura 16.

Los tumores de H1650 en el grupo tratado con vehículo (células H1650 solamente o más células T), demostraron un perfil de crecimiento relativamente agresivo *in vivo*. El crecimiento de los tumores de H1650 fue inhibido de manera significativa con niveles de dosis de 100, 10 y 1 µg/kg de 153 LP-DART y al final del experimento (SD49), el volumen promedio de los tumores era de 50 mm^3. Con un nivel de dosis de 10,1 µg/kg de 53 LP-DART, el crecimiento de los tumores de H1650 se había inhibido de manera significativa y al final del experimento (SD49) el volumen promedio de los tumores era de aproximadamente 400 mm^3.

Las diversas proteínas EK-DART, LP-DART y DART de control inhibieron el crecimiento de los tumores de HCT116, Du145 y H1650 implantados SC en ratones NOD/SCID en el contexto de modelo Winn cuando la dosificación fue iniciada en el día del implante y continuó durante 3 o más días consecutivos. En base a los criterios establecidos por el National Cancer Institute, las diversas proteínas DART con un nivel de dosis de 0,1 mg/kg y superior (TGI >58) se consideran como activas en los tres modelos.

Ejemplo 10

Modelo injertado PBMC de tumor humano establecido

Se establecieron cuatro modelos de tumores de xenoinjertos separados de cáncer colorrectal humano clasificados con expresión elevada (HCT116), media (SW480), baja (Ls174T) y negativa (SW620) de P-cadherina en base al análisis de citometría de flujo cuantitativa. El HCT116 demostró el nivel relativo más alto de la expresión de P-cadherina sobre la superficie de las células (43.801 ABC, Tabla 28), el SW480 demuestra un nivel relativamente moderado de la expresión de P-cadherina sobre la superficie de las células (12.665 ABC, Tabla 28) y el LS174T demuestra un nivel relativamente bajo de la expresión de P-cadherina sobre la superficie de las células (4.160 ABC, Tabla 28)

Unos animales NOD scid gamma (NSG) recibieron implantes subcutáneas en el flanco derecho con $5x10^6$ células de tumor HCT116, $5x10^6$ SW480, $2x10^6$ Ls174T o $5x10^6$ SW620 en el día 0. Siete días antes de la aleatorización (día 5), en base al crecimiento preciso de los tumores, los animales recibieron inoculaciones de $5x10^6$ células mononucleares de sangre periférica humana recién aislados (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) mediante inyección peritoneal de 0,2 mL de suspensión de células en PBS. Una semana después del implante de PBMC (día 12) se midió el volumen de los tumores en todos los animales del estudio y se recolectaron muestras de sangre para la citometría de flujo. Las células sanguíneas rojas de cada muestra fueron lisadas con una solución de BD Pharmlyse (BD Pharmingen) y las pellas celulares resultantes fueron teñidas en base a CD3 humano, CD4 humano, y CD8 humano, y se analizó mediante citometría de flujo utilizándose un instrumento BD Pharmingen LSRII con software de FACS Diva. Las células CD3+ humanas expresadas como porcentaje del total de linfocitos determinado mediante dispersión directa versus side scatter gating fueron establecidas para cada animal, y las mediciones de los tumores fueron recogidas para cada animal. Las mediciones de los tumores fueron recogidas mediante un calibre digital Vernier (Mitutoyo America,

Aurora, IL), y se calcularon los volúmenes mediante la fórmula modificada de la elipsoide: ½(ancho^2 × longitud).

Se utilizó la aleatorización con dos parámetros para establecer grupos de tratamiento de n=10 animales por grupo, proveyéndose una igual ponderación entre el volumen de los tumores y los valores de injerto de células CD3+ humanas. Los animales recibieron dosificaciones intravenosas con 0,05 mg/kg o 0,5 mg/kg de 153 LP-DART (CD3-1), con 0,5 mg/kg de control negativo biespecífico (fusión de proteína Fc diacuerpo heterodimérico vs. FITC y CD3 ypsilón) o DPBS como vehículo en la vena caudal lateral de cada animal. Se recolectaron mediciones semanales de los tumores a efectos de evaluar la inhibición del crecimiento de los tumores vs. los controles, junto con una supervisión continua en busca de signos de enfermedad de injerto versus hospedante (por ejemplo, pérdida de peso corporal, pérdida de pelo, posición encorvada).

En las Figuras 17A-17D se muestran gráficos de crecimiento de tumores que muestran el volumen tumoral (en mm^3) graficado versus tiempo; en las siguientes Tablas 32-35 se muestran los datos correspondientes. Los datos demuestran que las administraciones semanales de 153 LP- DART tuvieron como resultado una regresión de los tumores a la dosis más elevada (0,5 mg/kg) para los tumores de HCT116 (elevado), SW480 (medio), y una eficacia moderada a la dosis más elevada (0,5 mg/kg) para el modelo de tumor Ls174T (bajo). La administración del control biespecífico negativo no mostró ningún incremento en la inhibición tumoral en comparación con los ratones tratados con vehículo. En el modelo de tumor HCT116, Figura 17A, se muestra una inhibición del crecimiento tumoral de 61,9% y de 105,1% (TGI, inhibición del crecimiento de los tumores) con dosis de 0,05 y de 0,5 mg/kg de 153 LP-DART, respectivamente. Las Figuras 17A-17D demuestran además que la inhibición del crecimiento tumoral de los tumores de xenoinjerto establecidos dependían del nivel de expresión de la P-cadherina**.**

Tabla 32. Inhibición del crecimiento tumoral de los modelos del tumor de HCT116.

	Vehículo		**0,5 mg/kg Control LP-DART**		**0,05 mg/kg P-cadherina LP-DART**		**0,5 mg/kg P-cadherina LP-DART**	
Días a partir del inicio del estudio	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM
0	107	13	106	13	105	12	106	12
3	436	58	522	35	426	74	608	73
6	759	92	766	71	410	52	511	95
9	871	124	929	115	444	56	241	49
13	1005	127	1017	93	446	42	60	10

Tabla 33. Inhibición del crecimiento de los tumores en los modelos de tumor SW480

	Vehículo		0,5 mg/kg Control LP-DART		0,05 mg/kg P-cadherina LP-DART		0,5 mg/kg P-cadherina LP-DART	
Días desde el inicio del estudio	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM
0	67	6	68	7	68	6	64	7
4	132	14	130	18	123	13	101	13
7	167	12	180	37	129	8	81	13
11	232	31	216	40	157	20	26	3
14	305	39	278	42	240	41	10	3

Tabla 34. Inhibición del crecimiento de los tumores en los modelos de tumor Ls174T.

	Vehículo		0,5 mg/kg Control LP-DART		0,05 mg/kg P-cadherina LP-DART		0,5 mg/kg P-cadherina LP-DART	
Días desde el inicio del estudio	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM
0	121	12	121	14	118	13	126	18
3	301	43	328	40	366	51	393	51
7	686	103	801	59	619	104	420	107
10	1142	175	1099	116	796	110	451	106
14	1565	253	1456	206	1072	152	751	158

Tabla 35. Inhibición del crecimiento de los tumores con células T humanas injertadas de SW620

	Vehículo		0,5 mg/kg Control LP-DART		0,05 mg/kg P-cadherina LP-DART		0,5 mg/kg P-cadherina LP-DART	
Días desde el inicio del estudio	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM
0	308	29	305	29	319	28	304	28
3	467	74	605	76	440	37	441	64
7	622	102	628	91	480	47	528	106
10	1014	219	930	125	790	117	767	106

La Figura 17E muestra el análisis ANOVA de una vía del volumen de tumor (mm^3) recolectado en el día 25 después del implante del modelo de tumor HCT116 con el test de comparación múltiple de Dunnet con el grupo de control vehículo. Los datos demuestran una inhibición significativa del crecimiento de los tumores (*$p < 0,05$) tanto en el grupo dosificado con 0,05 mg/kg como en el grupo que recibió dosis de 0,5 mg/kg de 153 LP-DART.

Los resultados del análisis farmacocinético de los animales NSG portadores del tumor HCT116 tratados con 153 LP- DART de P-cadherina se muestran en la Tabla 36. Los animales recibieron una única dosis intravenosa de 0,05 o de 0,5 mg/kg de 153 LP- DART y fueron sacrificados bajo eutanasia en n=3 grupos en los instantes de tiempo indicados después de la dosificación, a efectos de recolectar el suero y el tumor. Se llevó a cabo el ensayo del LP- DART mediante ELISA sándwich vs. una curva estándar. El 153 LP- DART demostró tener una prolongada semivida de suero y

tumor.

Tabla 36. Análisis farmacocinético de los animales tratados con 153 LP- DART.

Dosis IV (mg/kg)	Tejido	Co (µg/mL)	Cmax (µg/mL)	Tmax (horas)	AUC(0-Tlast) (µg*horas/mL)	AUC(0,inf) (µg*horas/mL)	CL (0-t) (mL/kg/horas)	Vdss (L/kg)	T1/2 (horas)	T1/2 (días)
0,05	Suero	0,675	0,648	0,25	43,7	61	1,14	150	144	6
0,5	Suero	11,5	11	0,25	647	827	0,773	89,9	115	4,79
0,05	Tumor	nd	0,0561	48	7,48	10,8	nd	nd	130	5,42
0,5	Tumor	nd	1,04	48	167	199	nd	nd	88,4	3,68

Ejemplo 11

Modelo de transferencia adoptivo de células T humanas de tumor establecido

Se analizó la inhibición del crecimiento de los tumores con transferencia adoptiva de células T humanas de HCT116 (colon) y SUM149 (mama). El HCT116 demuestra el nivel relativo más elevado de la expresión de P-cadherina sobre la superficie de las células (43.801 ABC, Tabla 28) y el SUM149 demuestra un nivel relativamente moderado de la expresión de P-cadherina sobre la superficie de las células 15.426 ABC, Tabla 28). Unas células T fueron resuspendidas en $0{,}5x10^6$ células/ml con un medio OpTmizer CTS T Cell Expansion Libre de suero con 2X GlutaMax-1,1% PenStrep, y 20 ng/ml de IL-2 humano recombinante (Life Technologies, Carlsbad, CA). Unas perlas magnéticas de Dynabeads Human T-Expander CD3/CD28 (Life Technologies) fueron a continuación añadidas a las células T a razón de 1x10e6 perlas/ml (2 perlas/cxll), y las células fueron cultivadas durante una semana de acuerdo con el protocolo del fabricante. En el momento de la cosecha, las perlas fueron retiradas con un imán, y las células fueron suspendidas en DPBS a razón de $1x10^7$ células/ml para la inoculación in vivo.

Para los estudios de xenoinjertos, unos ratones NSG recibieron inoculaciones con sea $5x10^6$ HCT116 células en el flanco sea con $5x10^6$ SUM149 células en la almohadilla grasa mamaria en un volumen de inyección total de 0,2 mL. Unas células HCT116 fueron suspendidas en DPBS, mientras que unas células SUM149 fueron suspendidas en medio de cultivo y mezcladas 1:1 con Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Biosciences, San Jose, CA).

Las mediciones de los tumores fueron recolectadas mediante un calibre digital Vernier (Mitutoyo America, Aurora, IL), y se calcularon los volúmenes de los tumores mediante la fórmula modificada de la elipsoide 1/2 ($ancho^2$ x longitud). Los ratones fueron aleatorizados y recibieron la dosis inicial una vez que los tumores habían alcanzado la fase de crecimiento, y al día siguiente se inocularon $2x10^6$ células T cultivadas/ratón. Los ratones recibieron dosis de inyecciones de bolos de 0,2 mL

semanalmente hasta cinco veces, y todas las administraciones de compuesto y de células T fueron efectuadas por vía intravenosa en la vena caudal lateral de cada animal. Se recolectaron mediciones bisemanales de los tumores junto con una supervisión continua en busca de signos de enfermedad de injerto versus hospedante (por ejemplo, pérdida de peso corporal, pérdida de pelo, posición encorvada).

La inhibición del crecimiento de los tumores con transferencia adoptiva de células T humanas de HCT116 (de colon) se muestra en la Figura 18A (Tabla 37) y la correspondiente a SUM149 (de mama) se muestra en la Figura 18B (Tabla 38). La administración semanal de 153 LP- DART (CD3-1) tuvo como resultado una respuesta a la dosis con regresión del tumor a la dosis más elevada (0,5 mg/kg) y una éstasis tumoral con eventual recidiva a la dosis más baja (0,05 mg/kg). La administración del control negativo LP- DART no mostró ningún incremento en la inhibición del tumor en comparación con los ratones tratados con vehículo. En comparación con el modelo de células T injertados en lo que precede del Ejemplo 10, el modelo de transferencia adoptivo de las células T permite una dosificación prolongada de 153 LP- DART antes que los ratones sucumban al GVHD (2 semanas y ≥6 semanas, respectivamente).

Tabla 37. Inhibición del crecimiento de los tumores con transferencia adoptiva de células T humanas de HCT116.

	Vehículo		**0,05 mg/kg P-cadherina 153 LP-DART**		**0,5 mg/kg P-cadherina 153 LP-DART**	
Días a partir de la aleatorización	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM
0	144	11	147	10	147	12
4	310	22	333	19	333	34
8	573	37	429	31	430	34
11	803	38	365	35	354	35
15	1074	48	357	29	114	22
18	1340	53	473	30	65	22
22	1577	48	720	49	18	13
25	1655	53	911	56	0	0
29	-	-	1175	46	0	0
32	-	-	1339	44	0	0
35	-	-	1523	50	0	0
38	-	-	-	-	0	0
42	-	-	-	-	0	0
45	-	-	-	-	0	0

Tabla 38. Inhibición del crecimiento de los tumores con transferencia adoptiva de células T humanas de SUM149.

	Vehículo		**0,5 mg/kg Control LP-DART**		**0,05 mg/kg P-cadherina 153 LP-DART**		**0,5 mg/kg P-cadherina 153 LP-DART**	
Días a partir de la aleatorización	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM
0	208	5	207	5	209	6	207	13

	Vehículo		0,5 mg/kg Control LP-DART		0,05 mg/kg P-cadherina 153 LP-DART		0,5 mg/kg P-cadherina 153 LP-DART	
Días a partir de la aleatorización	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM
4	348	13	342	41	393	18	400	22
8	528	18	541	30	424	17	306	27
11	733	36	782	42	389	24	183	15
14	889	39	856	36	330	18	101	7
17	1132	42	1137	49	435	26	50	10
23	1464	61	1524	57	620	47	0	0
25	1671	81	1696	75	694	60	0	0
29	-	-	-	-	874	89	0	0
32	-	-	-	-	-	-	0	0
36	-	-	-	-	-	-	0	0
39	-	-	-	-	-	-	0	0
42	-	-	-	-	-	-	0	0

Ejemplo 12

Xenoinjerto derivado de paciente (PDX, Patient Derived Xenograft) positivo a P-cadherina

Se analizó la inhibición del crecimiento de los tumores de un PDX P-cadherina positiva. Se identificó un xenoinjerto de tumor colorrectal derivado de un paciente positivo a P-cadherina, PDX-CRX-11260, mediante tinción positiva de muestras de tumor FFPE con anticuerpo anti-P-cadherina. Se implantó tejido de tumor PDX-CRX-11260 en animales NSG y se dejó aumentar de tamaño hasta alcanzar aproximadamente 100 mm^3. Los animales fueron aleatorizados en grupos de dosis de n=7 y se dosificó con vehículo 0,05 mg/kg de 153 LP-DART (CD3-1), o con 0,5 mg/kg de 153 LP-DART (CD3-1) semanalmente. Un día después de la dosis inicial, todos los animales recibieron 2 x 10^6 células T humanas ampliadas in vitro.

La inhibición del crecimiento de los tumores de PDX-CRX-11260 se muestra en la Figura 19A (Tabla 39). El grupo con la dosis de 0,05 mg/kg de 153 LP- DART mostró que 3 de 7 animales tienen respuestas completas, y el grupo con la dosis de 0,5 mg/kg 153 LP-DART demostró que 7 de 7 animales tienen respuestas completas. Los datos demuestran que el 153 LP-DART presenta una potente inhibición del crecimiento de los tumores de un PDX de tumor de colon positivo a P-cadherina.

Tabla 39. Inhibición del crecimiento de los tumores PDX-CRX-11260 positivo a P-cadherina.

	Vehículo		0,05 mg/kg P-cadherina 153 LP-DART		0,5 mg/kg P-cadherina 153 LP-DART	
Días a partir de la Aleatorización	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM
0	107	6	106	5	106	6
5	206	22	226	23	215	22
8	311	20	290	37	186	16

	Vehículo		0,05 mg/kg P-cadherina 153 LP-DART		0,5 mg/kg P-cadherina 153 LP-DART	
Días a partir de la Aleatorización	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM	Volumen medio de los tumores (mm^3)	SEM
13	579	52	224	52	104	28
16	591	77	227	93	33	17
20	725	67	165	87	25	17
23	884	79	172	89	0	0
27	1101	99	292	161	0	0
30	1318	136	294	179	0	0
34	1463	161	370	240	0	0
37	1473	181	132	101	0	0
40	-	-	181	141	0	0

Ejemplo 13

Acumulación, dependiente de la dosis, de los linfocitos que se infiltran en los tumores (TIL)

Unos ratones portadores del tumor HCT116 que habían recibido injertos de PBMC (células mononucleares de sangre periférica humana) y que habían recibido dosis de variados niveles de 153 LP- DART (CD3-1) (n=3) fueron sacrificados bajo eutanasia a los 6 días después de la dosificación a efectos de evaluar los linfocitos C D3+ humanos que infiltran el tumor. Se recolectaron muestras de tumor en tubos gentleMACS C que contenían tampón de disociación de células tumorales (Miltenyi Biotech) y se procesaron en forma de suspensión de células individuales utilizándose el protocolo sugerido por el fabricante para los tumores humanos blandos mediante el instrumento disociador de tejidos gentleMACS (Miltenyi Biotech). Las suspensiones de células fueron seguidamente lavadas con DPBS que contenía EDTA 2mM, y se determinó el conteo de células viables mediante exclusión de azul de tripano y hemocitómetro. Se recolectaron $1x10^6$ células vivas de cada muestra en PBS que contenía FBS al 2% y azida de sodio al 0,02% y se tiñó con CD3 FITC (BD Pharmingen) durante 30 min sobre hielo. Después del lavado, se añadió yoduro de propidio a cada muestra inmediatamente antes del análisis para lo cual se utilizó LSRII con el software FACS Diva (BD Pharmingen).

Los datos fueron analizados mediante software FlowJo (Treestar) y se graficó el porcentaje de células CD3+ del total de eventos de células vivas en un gráfico agrupado, determinándose la significancia mediante ANOVA de 1 vía con Dunnett's Multiple Comparación test versus muestras de control no tratadas para lo cual se utilizó el software GraphPad Prism 5,0. Los resultados mostrados en la Figura 20 y en la Tabla 40 demuestran un incremento, dependiente de la dosis, en los linfocitos que se infiltran en los tumores (TILs). Además, la tinción de inmunohistoquímica (IHC) con CD3 en el tejido del tumor (no se muestra) demuestra que el tratamiento con 153 LP-

DART en los animales que tienen tumores P-cadherina positivos y células T humanas resultó en una acumulación intratumoral de linfocitos CD3+.

Tabla 40. Acumulación, dependiente de la dosis, de linfocitos que se infiltran en los tumores (TILs).

Dosis de 153 LP-DART	Ratón	% CD3+ de todas las células viables
0,01 mg/kg	1	7,60
	2	6,48
	3	12,40
0,05 mg/kg	1	43,00
	2	21,70
	3	25,70
0,5 mg/kg	1	61,30
	2	63,40
	3	50,30

Ejemplo 14

Biodistribución y direccionamiento a los tumores, de LP-DART de P-cadherina, utilizando formación de imágenes FMT

Se utilizaron ratones desnudos NSG o atímicos con xenoinjertos HCT116 subcutáneos establecidos. Los estudios que incluían el injerto de células T recibieron células T aisladas procedentes de voluntarios humanos saludables. Los estudios de biodistribución fueron iniciados cuando los tumores alcanzaron un volumen de 300-500 mm^3. P-cadherina 153 LP- DART (CD3-1) o un DART de control negativo (dominio no apuntado x dominio de unión de CD3) fue conjugado con fluoróforo VivoTag680XL (VT680) cercano a infrarrojo, con relaciones entre el etiquetado fluoróforo y biespecífico de entre 1 y 2,75, resultando: P-cadherina 153 LP-DART-VivoTag680XL y Control-LP-DART-VivoTag680XL.

La eficiencia del etiquetado fue determinada mediante espectrofotómetro. Las células utilizadas en los estudios de trafficking fueron etiquetadas con CellVue815 (CV815). La expresión de P-cadherina sobre la superficie de las células y la ligación de P-cadherina 153 LP- DART fueron determinadas mediante citometría de flujo. La actividad de las células T fue medida mediante ensayos con linfocitos T citotóxicos (CTL, cytotoxic T-lymphocyte (CTL). La formación de imágenes fue llevada a cabo longitudinalmente después de la inyección de los biespecíficos etiquetados. Los datos fueron analizados mediante software TrueQuant. Se colectaron el plasma y los tejidos en diferentes instantes del tiempo para el análisis PK por ELISA.

A. *In Vitro* Caracterización de las moléculas biológicas etiquetadas

Para determinar si el etiquetado con VT680 afectaba las propiedades de las moléculas, se llevaron a cabo estudios de control de calidad: la ligación *in vitro* a células mediante análisis de FACS y ensayos de citotoxicidad para establecer la

actividad de las moléculas. Las propiedades fueron comparadas para VT680 etiquetadas y control LP- DART no etiquetado y P-cadherina 153 LP- DART. Para las células T etiquetadas con CV815, también se evaluaron la expansión de las células T como también la citotoxicidad sobre las células efectoras. La Tabla 41 muestra las moléculas utilizadas para el estudio de biodistribución. DOL=grado de etiquetado.

Tabla 41. Moléculas etiquetadas con VivoTag680XL

Moléculas	DOL	~Ab/Dosis
P-cadherina 153 LP-DART-VivoTag680X	2,62	0,925 mg/kg
Control-LP-DART-VivoTag680XL	2,75	0,9 mg/kg

ELISA de P-cadherina soluble directo para evaluar la capacidad de ligación: la Figura 21A demuestra que el etiquetado de VT680 a P-cadherina 153 LP- DART tuvo un efecto mínimo sobre la ligación de P-cadherina. El incremento mínimo era dependiente de DOL. El Control-LP- DART (etiquetado o no etiquetado) no se ligó a la P-cadherina.

ELISA de CD3 soluble directo para evaluar la capacidad de ligación: la Figura 21B demuestra que el etiquetado con VT680 a P-cadherina 153 LP- DART redujo de manera significativo la ligación a la proteína CD3 ypsilon/delta. La disminución de la ligación era dependiente de DOL. El Control-LP- DART tuvo una menor ligación que el P-cadherina 153 LP-DART. El etiquetado con VT680 redujo de manera significativa la ligación a CD3 ypsilon/delta.

Unas células HCT116 que expresan luciferasa fueron utilizadas como células “objetivo” para los ensayos de citotoxicidad *in vitro* con células “efectoras” linfocitos T humanas purificadas en un ensayo de 24 horas con una relación 10:1 efectoras/objetivo vs. una titulación de P-cadherina 153 LP-DART. El gráfico de citotoxicidad mostrado en la Figura 21C ilustra que la citotoxicidad se redujo cuando el P-cadherina 153 LP- DART fue etiquetado con VT680 a 2,0 DOL.

Comparación de la viabilidad de las células y de la expansión de las células T después del etiquetado con tintes que etiquetan células: unas células T humanas aisladas de donantes fueron etiquetadas con tintes fluorescentes para rastrear células – VivoTrack680 y CellVue815 (CV815). La Figura 21D demuestra que ni el VivoTrack680 ni el CV815 afectaban la viabilidad de las células o la expansión de las células T.

B. Formación de Imágenes FMT *in vivo* y datos del análisis por PK

La biodistribución y direccionamiento de P-cadherina 153 LP- DART en el modelo de xenoinjerto HCT116 fueron analizados mediante formación de imágenes FMT longitudinal. Un millón de células HCT116 en matrigel al 50% fueron inyectadas

en los flancos SQ de ratones nu/nu hembra (de 8 semanas de edad). Se permitió que los tumores crecieran hasta adquirir un tamaño de aproximadamente 300-500 mm^3. Los animales recibieron inyecciones de sondas (Moléculas biológicas etiquetadas con VT680) equivalente a 1 nmol de VT680 (Tabla 41). Se llevó a cabo la formación de imágenes por FMT *in vivo* (cuerpo entero) longitudinalmente a los 5 min, 24 h, 48 h, 96 h y 240 h después de la inyección. Se recolectaron muestras de sangre (plasma) en cada instante de tiempo. En instantes de tiempo intermitentes y al final del estudio, los animales fueron sacrificados bajo eutanasia y se efectuó una perfusión con PBS/solución salina a efectos de remover la sangre del compartimiento vascular. Los tejidos (tumor, hígado, bazo, riñones, pulmones y cerebro) fueron objeto de formación de imágenes *ex vivo*. Los datos de FMT fueron analizados mediante software de TrueQuant. Después de la formación de imágenes *ex vivo*, los tejidos fueron congelados instantáneamente para futuros análisis de PK. Los análisis de PK de muestras de plasma y de tejido fueron llevados a cabo mediante ELISA. En el estudio de biodistribución, no se llevó a cabo el injerto de células T.

La formación de imágenes por FMT mostró que el P-cadherina 153 LP- DART apuntaba específicamente a los tumores HCT116. La formación de imágenes por FMT *in vivo* no invasivo reveló elevados niveles de la acumulación de P-cadherina 153 LP-DART en los tumores (no se muestran las imágenes) en comparación con el LP-DART de control. La cinética *in vivo* reveló que la acumulación en los tumores tuvo lugar a proximadamente 96 horas después de la inyección, como se muestra en la Figura 22A. El conjunto de datos de distribución corporal y de eliminación que demuestran el compuesto de acumulación y eliminación de diversos tejidos, compartimentos de tumor y vascular no mostraron una significativa diferencia global entre P-cadherina 153 LP- DART y control-LP-DART, como se muestra en la Figura 22B.

Como se muestra en las Figuras 22C y 22D, el análisis ex vivo del tumor y de los tejidos seleccionados a las 48, 96 y 240 horas demostró que el P-cadherina 153 LP- DART penetró en el tejido. Los tumores mostraron una acumulación 20-30 veces más elevada de P-cadherina 153 LP- DART en comparación con el control-LP- DART en todos los instantes de tiempo. A las 240 horas después de la inyección, había todavía P-cadherina 153 LP- DART medible detectado en los tumores. La comparación ex vivo de la acumulación en diversos órganos (hígado (Figura 22D), riñones, bazo, pulmones y cerebro) no mostró una diferencia entre P-cadherina 153 LP- DART y DART de control negativo.

Se llevó a cabo una comparación de los datos de FMT con los métodos

farmacocinéticos para confirmar los perfiles de la formación de imágenes por FMT. Unas muestras del estudio de FMT fueron evaluadas mediante un método farmacocinético rutinario, el ELISA. Los datos de PK de tumor e hígado mostraron tendencias similares a las de los datos correspondientes a la formación de imágenes por FMT arriba descritos. Como se muestra en la Figura 23A, el perfil del plasma mostró una exposición aproximadamente 2-3 mayor del P-Cad-LP- DART en comparación con Control-LP-DART. Como se muestra en la Figura Figure 23B, la evaluación de la muestra de tumor e*x vivo* mostró un incremento de aproximadamente 7 veces en la acumulación de P-Cad-LP-DART. Como se muestra en la Figura 23C, la evaluación de muestras de hígado ex vivo mostró una acumulación incrementada a las 48 horas, sin embargo, no hubo una diferencia significativa a las 96 y 240 horas.

C. Rastreo celular de células T injertadas

Se llevó a cabo el rastreo celular de células T injertadas en el modelo HCT116 utilizándose la formación de imágenes por FMT. Un millón de células HCT116 en matrigel al 50% fueron inyectadas en los flancos SQ de ratones NSG hembra (de 8 semanas de edad). Cuando los tumores tuvieron un tamaño de aproximadamente 300-500 mm^3, se inyectó P-cadherina 153 LP- DART (etiquetado o no etiquetado con VT680) por vía SQ. Después de 24 horas de haberse inyectado los fármacos, se inyectaron cinco millones de células T etiquetadas con CV815 por vía IV. La formación de imágenes por FMT se llevó a cabo longitudinalmente después del injerto de las células. Se llevó a cabo la formación de imágenes secuencial mediante láser a 680 nm y 800 nm para los grupos de P-cadherina 153 LP-DART-VT680 y Células T-CV815.

Los estudios de trafficking celular con células T etiquetadas con CellVue mostraron la colocalización de las células T y de P-cadherina 153 LP- DART en los tumores. Como se muestra en la Figura 24A, la evaluación de la actividad de las células T de las células T etiquetadas con CV815 y no etiquetadas muestra que el etiquetado de las células T con fluoróforo no tuvo un efecto sobre la capacidad citotóxica de las células T (*in vitro*). Como se muestra en la Figura 24B, la cinética del trafficking *in vivo* de las células T etiquetadas con fluoróforo en el tumor por formación de imágenes por FMT demuestra un trafficking significativamente incrementado de células T y su acumulación en el día 7 después del injerto de células en el grupo que recibió inyecciones de P-cadherina 153 LP- DART.

Las imágenes de FMT (no se muestran) muestran un direccionamiento de P-cadherina 153 LP- DART etiquetado con VivoTag680 y el trafficking de células T etiquetadas con CV815 en los días 5 y 7 después del injerto de las células. Este grupo

recibió células T etiquetadas con CV815 s + P-cadherina 153 LP- DART etiquetado con VivoTag680. Se utilizó P-cadherina 153 LP-DART-VT680 con un DOL de 1,0. Un DOL de 1,0 demostró afectar de manera mínima la ligación a las proteínas P-cadherina y CD3.

Ejemplo 15

Cristalización y determinación de la estructura

Para los ensayos de cristalización se utilizó una proteína DART purificada mostrada en la Figura 25. En particular, la proteína DART (que tiene un dominio de ligación de clon 35 P-CAD VL/VH y un dominio de ligación de clon CD3) se diseñó para cristalografía sin dominios promotores de heterodímero y que tiene un rótulo His C-terminal HHHHHH (SEQ ID NO: 78) designado como “6XHIS” ligado de manera covalente al dominio P-CAD 35 VH y una secuencia FLAG C-terminal FLAG GGCGGDYKDDDDK (SEQ ID NO: 79) designada como “FLAG” ligado de manera covalente a un dominio CD3 VH (que en la presente llevará la denominación de “35 DART de cristalografía”).

El 35 DART purificado de cristalografía fue concentrado a 9,6 mg/ml en una solución de proteínas que contenía TBS. Los cristales se obtuvieron mediante un método de hanging-drop vapor-diffusion partiéndose de una condición que contenía PEG 8K al 15% y sulfato de litio 0,5 M. Los cristales, similares a placas hexagonales, tenían una simetría compatible con el grupo espacial trígono P321 con parámetros celulares a=b=142,81 Å; c=62,69 Å y con una molécula de 35 DART en la unidad cristalográfica asimétrica. Los cristales fueron crioprotegidos mediante una solución de trabajo que contenía etilenglicol al 25% y fueron congelados instantáneamente en nitrógeno líquido. Se recolectó un conjunto de datos ajustado con una resolución de 2,0 Å a partir de un único cristal congelado con una línea de haz INCA 17-ID en el Argonne National Laboratory (APS). Los datos fueron procesados y escalados mediante autoPROC y SCALA.El conjunto final de datos estaba completo en un 96,8 % con una redundancia promedia de 9,9 y con un R_{sym} de 14,2 %.

Se determinó la estructura mediante reemplazo molecular con PHASER empezándose con los modelos de fragmento Fv de cadena simple preparados a partir del código de entrada de Brookhaven PDB, 1moe. Se obtuvo la solución buscando cada una de las cuatro subunidades de la molécula 35 DART de cristalografía por separado. Varias rondas iterativas para el ajuste manual y para la reconstrucción del modelo en base al COOT y al refinamiento cristalográfico mediante autoBUSTER permitieron obtener el modelo 35 DART de cristalografía final con un $R_{trabajo}$

cristalográfico del 17,6 % y un R_{libre} de 20,5%, donde $R_{trabajo}$= $||F_{obs}| - |F_{calc}|| / |F_{obs}|$ y R_{libre} es equivalente a $R_{trabajo}$, pero calculado para un 5% elegido aleatoriamente omitido del proceso de refinación.

El modelo 35 DART de cristalografía comprendía dos cadenas, pesada (H) y liviana (L), con los residuos 1-110, 117- 239 de la cadena H y con los residuos 2-110, 116-246 de la cadena L. Los átomos no proteína presentes en el modelo incluían 574 moléculas de agua y 5 iones sulfato. Los aminoácidos faltantes en las regiones ligador (11 residuos) no fueron modelados en la estructura debido a la falta de densidad electrónica presumiblemente debido a un desorden.

La Figura 26 muestra una ilustración gráfica de la estructura cristalina de la proteína 35 DART de cristalografía. En el cristal, el 35 DART de cristalografía se ensambló en una estructura esférica muy compacta que difería considerablemente de las estructuras del díacuerpo anteriormente publicadas (Figura 27) (Véase Carmichael et al., J. Mol. Biol. 326: 341-351 (2003); Perisic, et al., Structure, 2(12): 1217-1226, (1994)). Tiene una interfaz imprevistamente amplia entre sus subunidades, y una evidencia manifiesta para la estabilización estructural mediante un enlace disulfuro entre la dos cadenas polipeptídicas, Cys^{239} (VH1B) - Cys^{246} (VL2A). Las cuatro subunidades, VL1A VH1B, VL2B y VH2A, han contribuido, todas ellas, a la interfaz de ligación, proviniendo la mayor parte de la contribución de los residuos de aminoácidos de armazón de ambas cadenas. Esta última observación sugirió que otras proteínas DART, construidas con otras secuencias de CDR, con ligación a diversos antígenos asociados a tumores, pueden compartir una arquitectura similar y una interfaz del dominio singular con el 35 DART de cristalografía.

A pesar del empacado relativamente apretado, la interfaz del 35 DART de cristalografía no estaba tan enriquecida ni tenía una configuración tan complementaria como las interfaces de presentación natural de las moléculas Fab, caracterizadas por un elevado grado de asociación entre los dominios de cadenas pesadas y livianas. En el 35 DART de cristalografía, unas pocas depresiones en una cadena o dominio que no fueron complementadas mediante salientes en otros, resultaron en pequeños defectos de empacado interiores y en grandes vacíos, llenos de agua vinculada a la estructura cristalina (Figura 28).

Los dos sitios de ligación a antígeno en el 35 DART de cristalografía estaban separados entre sí en aproximadamente 40 Å y estaban situados en lados ortogonalmente opuestos de la molécula. En este contexto, la expresión “lados ortogonalmente opuestos” significa que los dos sitios de ligación en el 35 DART de

cristalografía estaban opuestos entre sí en un ángulo de aproximadamente 90°.

Las regiones anti-CD3 CDR estaban posicionadas remotamente con respecto a la interfaz de subunidades, mientras que las regiones anti-P-CAD CDR se hallaban dentro de un área más adyacente (véase la Figura 27).

Por otra parte, fueron generadas novedosas variantes de DART de cadena única (scDART) para resolver el problema de la falta de apareamiento de los dos diacuerpos de cadena (es posible utilizar varias direccionalidades de cadena VH y VL en base a la estructura cristalina). Se diseñaron residuos cisteína adicionales para inducir la ligación covalente dentro de las proteínas scDART a efectos de reforzar más aun la estabilidad del diacuerpo de cadena única. El método era una variación de Dani et al. (Prot. Eng. 16(3): 187-193 (2003)) en el que se utilizó un análisis posterior para categorizar la calidad de cada sitio. También se diseñaron varias ubicaciones de enlace disulfuro utilizándose este método para reducir la accesibilidad del solvente del enlace disulfuro como también para reducir la longitud de los ligadores. Por ejemplo, la modelación de posiciones para introducir disulfuros estereoquímicamente óptimos sugirió los siguientes pares de residuos de aminoácidos para la mutagénesis de la cisteína (véase la Figura 29): Gln^{121}(VH1B)Gly^{160}(VL1A), Val^{129}(VH1B)Gly^{244}(VL1A), Val^{123}(VH1B)Gly^{160}(VL1A), Gly^{126}(VH1B)Ser^{242}(VL1A), y Ala^{127}(VH1B)Ser^{242}(VL1A).

Además, y utilizándose los protocolos para la predicción de la estabilidad de Discovery Studio (Accelrys Software Inc) y el protocolo de estabilidad de Rosetta v2, 3, se diseñaron variantes de DART (inclusive variantes de scDART) por intermedio de mutagénesis dirigido a sitio en la interfaz de interdominio a efectos de rellenar grandes vacíos/orificios interiores (Figura 26) en una tentativa para mejorar más aún la estabilidad de la asociación interdominio. Por ejemplo, mediante el incremento de los volúmenes de cadenas laterales en las posiciones Ala^{44}(VL1A), Val^{213}(VH2A), Leu^{238}(VH2A), o Met^{231}(VL2B) mediante el reemplazo de los aminoácidos relativamente pequeños por aminoácidos con cadenas laterales aromáticas voluminosas tales como fenilalanina, tirosina, o triptófano. También se diseñaron mutantes de cisteína de superficie simple probando diversas posiciones sobre la base de la estructura cristalina para un enfoque de bioconjugación sitio-específico.

Ejemplo 16

Mapeo de epítopos de P-cadherina 153 LP- DART

Para identificar el epítopo de ligación del P-cadherina 153 LP-DART, se generaron constructos de proteínas de fusión solubles del dominio extracelular (ECD, dominio extracelular)- Fc. Cada constructo P-cadherina-Fc comprendía un péptido de

señal, propéptido y una región de subdominio P-cadherina ECD (sea ECD1, ECD1-2, ECD1-3, ECD1-4, o ECD1-5) genéticamente fusionado a la bisagra y dominios de CH2 y CH3 de IgG1 humano mediante ligador desdoblable, como se muestra en la Figura 34. Los fragmentos de subdominio de ECD1, ECD2, ECD3, ECD4, y ECD5 P-cadherina utilizados para generar los constructos ECD-Fc se corresponden a las secuencias identificadas en el epítopo de P-cadherina de longitud completa (UniProt P22223, CADH3, Cadherina-3 humana), mostrada en la Figura 35 y mejor caracterizada en la Tabla 42.

Tabla 42. Dominios y subdominios de P-cadherina generados

Dominio	Residuos	SEQ ID NO:
P-cadherina de longitud completa(UniProt P22223)	1-829	159
Péptido señal de P-cadherina	1-24	160
Propéptido de P-cadherina	25-107	161
P-cadherina, dominio extracelular 1	108-215	162
P-cadherina, dominio extracelular 2	216-328	163
P-cadherina, dominio extracelular 3	329-440	164
P-cadherina, dominio extracelular 4	441-546	165
P-cadherina, dominio extracelular 5	547-650	166
P-cadherina, transmembranal y citoplásmico	651-829	167
P-cadherina, dominio extracelular 1-2	108-328	168
P-cadherina, dominio extracelular 1-3	108-440	169
P-cadherina, dominio extracelular 1-4	108-546	170
P-cadherina, dominio extracelular 1-5	108-650	171

Todos los constructos fueron confirmados mediante secuenciado transitorio en células 293 KEK de LibreStyle™ (Life Technologies, Grand Island, NY) siguiendose las instrucciones del fabricante, y expresadas a lo largo de 5- 7 días. Para un procesamiento reforzado del propéptido, se cotransfectó un vector de expresión que contenía la enzima de desdoblamiento de PACE junto con el vector que contenía la P-cadherina. La proteína soluble de interés fue purificada mediante técnicas cromatográficas de proteína A Estándar (Protein A FF, GE Healthcare, Piscataway, NJ) seguido por cromatografía de exclusión de tamaño por filtración a través de gel (Superdex200, GE Healthcare, Piscataway, NJ). La proteína purificada se caracterizó en base a la actividad según ELISA, utilizándose anticuerpos monoclonales y policlonales de P-cadherina antihumanos disponibles en el comercio. Unos constructos de P-cadherina ECD-Fc fueron utilizados en un ELISA de proteína para determinar a cuáles uno o más subdominios de P-cadherina se ligó el 153 LP-DART.

La Tabla 43 muestra los resultados de la ligación de las moléculas de 153 LP-DART, y de diversas otras moléculas de anti-P-cadherina DART a los constructos P-cadherina ECD-Fc generados, junto con un Ab policlonal (R&D Systems, Minneapolis, MN) utilizado para confirmar la adecuada expresión y plegado de los constructos ECD-

Fc. Los resultados muestran que el 153 LP-DART no se ligó a ECD1-Fc ni a ECD1-2-Fc, sino que se ligó a todos los constructos que contienen ECD3 (ECD1-3-Fc, ECD1-4-Fc y ECD1-5-Fc). Estos datos demuestran que el 153 LP-DART se liga a P-cadherina humana dentro del ECD3.

Tabla 43. Ligación de los P-cadherina DART a constructos P-cadherina ECD-Fc

Constructo P-cad ECD –Fc	35 EK-DART	153 EK-DART	153 LP-DART	PF EK-DART	20 EK-DART	30 EK-DART	Ab policlonal (AF-761)
ECD 1-Fc	No	No	No	No	No	Sí	Sí
ECD 1-2-Fc	No	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
ECD 1-3-Fc	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
ECD 1-4-Fc	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
ECD 1-5-Fc	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

Como se muestra en la Tabla 24 (arriba, el 153 LP-DART no se liga a la P-cadherina murina, y por lo tanto el 153 LP-DART reconoce un epítopo sobre el ECD3 de la P-cadherina humana (SEQ ID NO: 164) donde difiere en secuencia del ECD3 de P-cadherina murina (SEQ ID NO: 172). La Tabla 44 muestra una alineación de P-cadherina humana y murina ECD-3 e ilustra las diferencias entre estos ortólogos. (;) representa residuos similares, (.) representa residuos diferentes y (–) representa residuos muy diferentes.

Tabla 44. Alineación de dominio extracelular 3 (ECD 3) de P-cadherina humana y de ratón.

ECD3	Secuencia
huPcadECD3 muPcadECD3	DPQKYEAHVPENAVGHEVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLIMGGDDGDHFTITTHPESN QGILTTRK EPQKYEAWVPENEVGHEVQRLTVTDLDVPNSPAWRATYHIVGGDDGDHFTITTHPETN QGVLTTKK :******-****-**********.**********- *:**********:***:***:*
huPcadECD3 muPcadECD3	GLDFEAKNQHTLYVEVTNEAPFVLKLPTSTATIVVHVEDVNEAPVF (SEQ ID NO: 164) GLDFEAQDQHTLYVEVTNEAPFAVKLPTATATVVVHVKDVNEAPVF (SEQ ID NO: 172) ******::**********.:****:***:****:********

Para determinar si el epítopo de ligación y la afinidad de ligación tienen un efecto sobre la potencia en los ensayos de citotoxicidad de redireccionamiento a las T, se analizaron los resultados de los ensayos de CTL (linfocitos T citotóxicos) para diversos anti-P-cadherina EK-DART. Los valores de citotoxicidad (véase la Tabla 29) fueron comparados con la afinidad de ligación a P-cadherina expresado sobre la superficie de las células mediante Biacore y ELISA (véanse las Tablas 14-16, 24). El PF-DART se liga a P-cadherina EN ECD2 con una afinidad de ligación nM de un sólo

dígito y tiene una actividad citotóxica CTL sub-nM. El 35 EK-DART (clon genitor de 153 EK-DART) se liga a P-cadherina in ECD3 con una afinidad de ligación de aproximadamente 35 nM, casi 35 veces menos que el PF-DART todavía elimina con una potencia similar (sub-nM). Estos datos sugieren que la ligación en ECD3, que se halla más cercana a la membrana de la célula, tiene como resultado una mayor potencia de CTL. El 153 LP-DART también se liga a P-cadherina en ECD3 con una afinidad de ligación mucho más fuerte que el 35 EK-DART (0,5 nM), y muestra la mayor actividad de CTL (sub-pM).

Ejemplo 17

Mapeo de parátopes de anti-P-cadherina CDRs

Para entender mejor qué residuos de aminoácidos (AA) en las CDR (región determinadora de complementariedad) intervienen en la ligación de scFv 153 a la P-cadherina humana, todos los CDR AA no alanina fueron individualmente mutados en alanina mediante mutagénesis paralela dirigida al sitio.

Mutagénesis dirigida al sitio

Se diseñaron tres oligos (de 33-45 bases de longitud) (Tabla 45). Se ajustó la longitud de los oligos de manera que tengan valores de temperatura de fusión (Tm) predichas comparables. Cada oligo fue diseñado de manera de ser el complemento inverso de la cadena de sentido del clon 153 scFv y de manera de estar rodeado por 15-21 bases en cualquiera de los lados en el “AGC” (Complemento inverso del codón de alanina, GCT).

Tabla 45. Oligos diseñados.

Nombre de la secuencia	Secuencia	Tm	SEQ ID NO.
pcdAlaH1-1	GCT GGT AAA GGT GTA AGC AGA AGC CTT GCA GGA	66	173
pcdAlaH1-2	ACC GTA GCT GGT AAA GGT AGC ACC AGA AGC CTT GCA GGA	69	174
pcdAlaH1-3	GAT ACC GTA GCT GGT AAA AGC GTA ACC AGA AGC CTT GCA	66	175
pcdAlaH1-4	GAT ACC GTA GCT GGT AGC GGT GTA ACC AGA AGC	65	176
pcdAlaH1-5	CCA GCT GAT ACC GTA GCT AGC AAA GGT GTA ACC AGA AGC	66	177
pcdAlaH1-6	CAC CCA GCT GAT ACC GTA AGC GGT AAA GGT GTA ACC AGA	67	178
pcdAlaH1-7	TCG CAC CCA GCT GAT ACC AGC GCT GGT AAA GGT GTA ACC	70	179
pcdAlaH1-8	TCG CAC CCA GCT GAT AGC GTA GCT GGT AAA GGT	67	180
pcdAlaH1-9	CTG TCG CAC CCA GCT AGC ACC GTA GCT GGT AAA	68	181
pcdAlaH1-10	GGC CTG TCG CAC CCA AGC GAT ACC GTA GCT GGT	71	182
pcdAlaH2-1	ACC ATT GTA AGC GCT GAT AGC TCC CAT CCA CTC AAG CCC	69	183
pcdAlaH2-2	GTT ACC ATT GTA AGC GCT AGC CCA TCC CAT CCA CTC AAG	67	184
pcdAlaH2-3	TGT GTT ACC ATT GTA AGC AGC GAT CCA TCC CAT CCA CTC	66	185
pcdAlaH2-5	TGC ATA GTT TGT GTT ACC ATT AGC AGC GCT GAT CCA TCC CAT CCA	68	186
pcdAlaH2-6	TGC ATA GTT TGT GTT ACC AGC GTA AGC GCT GAT CCA TCC	67	187
pcdAlaH2-7	CTG TGC ATA GTT TGT GTT AGC ATT GTA AGC GCT GAT CCA	65	188
pcdAlaH2-8	GAG CTT CTG TGC ATA GTT TGT AGC ACC ATT GTA AGC GCT GAT CCA	67	189
pcdAlaH2-9	GAG CTT CTG TGC ATA GTT AGC GTT ACC ATT GTA AGC GCT	65	190
pcdAlaH2-10	CTG GAG CTT CTG TGC ATA AGC TGT GTT ACC ATT GTA AGC	65	191
pcdAlaH2-11	GCC CTG GAG CTT CTG TGC AGC GTT TGT GTT ACC ATT GTA	68	192
pcdAlaH2-13	GAC TCT GCC CTG GAG CTT AGC TGC ATA GTT TGT GTT ACC	66	193
pcdAlaH2-14	GGT GAC TCT GCC CTG GAG AGC CTG TGC ATA GTT TGT GTT	69	194
pcdAlaH2-15	CAT GGT GAC TCT GCC CTG AGC CTT CTG TGC ATA GTT TGT	68	195
pcdAlaH2-16	GGT CAT GGT GAC TCT GCC AGC GAG CTT CTG TGC ATA GTT	69	196

pcdAlaH2-17	GGT CAT GGT GAC TCT AGC CTG GAG CTT CTG TGC	67	197
pcdAlaH3-1	ACC AAA AGC ATT AGC TGT ATC AGC AGT CGC ACA GTA ATA CAC GGC	67	198
pcdAlaH3-2	AAA AGC ATT AGC TGT AGC GAT AGT CGC ACA GTA	62	199
pcdAlaH3-3	GAT ACC AAA AGC ATT AGC AGC ATC GAT AGT CGC ACA GTA	64	200
pcdAlaH3-5	GCC CCA GAT ACC AAA AGC AGC AGC TGT ATC GAT AGT CGC	68	201
pcdAlaH3-7	TTG GCC CCA GAT ACC AGC AGC ATT AGC TGT ATC	65	202
pcdAlaH3-8	CCC TTG GCC CCA GAT AGC AAA AGC ATT AGC TGT	66	203
pcdAlaH3-9	CAT TGT CCC TTG GCC CCA AGC ACC AAA AGC ATT AGC TGT	69	204
pcdAlaL1-1	GTT GGA GCT GCT TCC AGC GCA GGA GAT GGT GAC	69	205
pcdAlaL1-2	AAT GTT GGA GCT GCT AGC AGA GCA GGA GAT GGT	66	206
pcdAlaL1-3	ATT CCC AAT GTT GGA GCT AGC TCC AGA GCA GGA GAT GGT	68	207
pcdAlaL1-4	ATT ATT CCC AAT GTT GGA AGC GCT TCC AGA GCA GGA GAT	66	208
pcdAlaL1-5	ATA ATT ATT CCC AAT GTT AGC GCT GCT TCC AGA GCA GGA	65	209
pcdAlaL1-6	GGA TAC ATA ATT ATT CCC AAT AGC GGA GCT GCT TCC AGA GCA GGA	67	210
pcdAlaL1-7	GGA TAC ATA ATT ATT CCC AGC GTT GGA GCT GCT TCC AGA	65	211
pcdAlaL1-8	CCA GGA TAC ATA ATT ATT AGC AAT GTT GGA GCT GCT TCC	62	212
pcdAlaL1-9	GTA CCA GGA TAC ATA ATT AGC CCC AAT GTT GGA GCT GCT	65	213
pcdAlaL1-10	CTG GTA CCA GGA TAC ATA AGC ATT CCC AAT GTT GGA GCT	65	214
pcdAlaL1-11	CTG CTG GTA CCA GGA TAC AGC ATT ATT CCC AAT GTT GGA	65	215
pcdAlaL1-12	GAG CTG CTG GTA CCA GGA AGC ATA ATT ATT CCC AAT GTT	64	216
pcdAlaL1-13	TGG GAG CTG CTG GTA CCA AGC TAC ATA ATT ATT CCC AAT	65	217
pcdAlaL2-1	TGA GGG TCG CTT ATT ATT AGC ATA AAT GAG GAG TTT GGG	63	218
pcdAlaL2-2	CCC TGA GGG TCG CTT ATT AGC GTC ATA AAT GAG GAG TTT	65	219
pcdAlaL2-3	AAT CCC TGA GGG TCG CTT AGC ATT GTC ATA AAT GAG GAG	65	220
pcdAlaL2-4	GTC AGG AAT CCC TGA GGG TCG AGC ATT ATT GTC ATA AAT GAG GAG	66	221
pcdAlaL2-5	TCG GTC AGG AAT CCC TGA GGG AGC CTT ATT ATT GTC ATA AAT GAG	66	222
pcdAlaL2-6	TCG GTC AGG AAT CCC TGA AGC TCG CTT ATT ATT GTC ATA	64	223
pcdAlaL2-7	TCG GTC AGG AAT CCC AGC GGG TCG CTT ATT ATT	66	224
pcdAlaL3-1	GCT GCT ATC CCA TGT AGC GCA GTA ATA ATC GGC	64	225
pcdAlaL3-2	CAG GCT GCT ATC CCA AGC TCC GCA GTA ATA ATC	64	226
pcdAlaL3-3	ACC ACT CAG GCT GCT ATC AGC TGT TCC GCA GTA ATA ATC	66	227
pcdAlaL3-4	ACC ACT CAG GCT GCT AGC CCA TGT TCC GCA GTA	69	228
pcdAlaL3-5	CAC ACC ACT CAG GCT AGC ATC CCA TGT TCC GCA	68	229
pcdAlaL3-6	GAA TAC CAC ACC ACT CAG AGC GCT ATC CCA TGT TCC GCA	68	230
pcdAlaL3-7	GCC GAA TAC CAC ACC ACT AGC GCT GCT ATC CCA TGT TCC	69	231
pcdAlaL3-8	GCC GAA TAC CAC ACC AGC CAG GCT GCT ATC CCA	70	232
pcdAlaL3-9	TCC GCC GAA TAC CAC AGC ACT CAG GCT GCT ATC	68	233
pcdAlaL3-10	CCC TCC GCC GAA TAC AGC ACC ACT CAG GCT GCT	71	234
pcdAlaL3-11	GGT CCC TCC GCC GAA AGC CAC ACC ACT CAG GCT	72	235

Se produjo ADN monocatenario utilizándose un protocolo publicado (Tonikian R et al, Nat. Protoc. 2007; 2(6):1368-86). En pocas palabras, un vector de expresión de fago fue transformado en células CJ236 electro-competentes de acuerdo con el protocolo del fabricante (Lucigen, Middleton, WI) y 0,05% de las células fueron aplicados como recubrimientos o de placas LB/Amp. Después de cultivo durante la noche, seis cultivos de 1 mL, cultivados en 2xTY/2% glucosa suplementado con 100 µg/mL de ampicilina, 10 ug/mL de cloramfenicol, y partículas de fago helper 1e+10 M13KO7, recibieron inoculaciones con colonias independientes y se cultivó 37°C durante 2 horas antes de añadir kanamicina a 25 µg/mL. Después de 4 horas más de agitación a 37°C, los cultivos que mostraban una turbiedad fueron recolectados y expandidos a un cultivo de 120 mL (2xTY/2% glucosa suplementada con 100 µg/mL de ampicilina, 25 µg/mL de kanamicina, 0,25 µg/mL de uridina) en un frasco de 2 L provisto de deflector. Después de cultivo durante la noche, el material sobrenadante fue recuperado por medio de centrifugación (6.000 rpm, 10 minutos) y se añadieron 20

mL de PEG/NaCl a 100 mL de material sobrenadante, y se purificaron los fagos mediante precipitación con PEG. Los fagos purificados (resuspendidos en 1 mL de PBS) fueron lisados y se purificó el ADN de uracilo monocatenario (kit Qiaprep spin M13, Cat. #: 27704) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN fue cuantificado mediante Nanodrop (Thermo).

Los oligos fueron ordenados en forma normalizada en tampón tris-EDTA (50 µM en 200 µL). A continuación, 200 pmoles de cada oligo (4 µL) fueron fosforilados en un formato de 96 cavidades a 37°C durante 90 minutos y se desactivó térmicamente a 65°C durante 20 minutes. La mezcla reactiva contenía lo siguiente: 4 µL de oligo, 2 µL tampón 10x PNK, 2 µl de ATP 10 mM, 1 µL de DTT 100 mM, 11 µL de agua, 2 µL de T4 PNK (T4 polinucleótido quinasa). Las reacciones de mutagénesis sitio-dirigidas fueron establecidas en un formato de 96 cavidades como sigue: 2,2 µL de ADN plantilla de uracilo monocatenaria (200 ng), 2 µL de tampón Pfu Turbo Cx, 2 µL de DTT 100 mM, 0,4 µL de NAD+, 0,16 µL de dNTPs, 10 µL de agua, 0,2 µL (0,5 unidades de Pfu turbo Cx), 1 µL de Taq ADN ligasa, 2 µL de reacción de fosforilación 20 veces diluido (0,9 pmoles). La reacción fue sometida a incubación como sigue: 95°C durante 3 min, 55°C durante 90 sec, 68°C durante 15 min, 45°C durante 15 min. Seguidamente, se añadió 1 µL (1 pmol) de OmpA oligo 5' fosforilado, y la reacción fue sometida a incubación como sigue: 95°C durante 30 sec, 55°C durante 45 sec, 68°C durante 10 min, 45°C durante 15 min. Después de estas incubaciones, se añadieron 2 µL o 2 unidades de UDG: Uracil ADN glicosilasa y 5 unidades de enzima endonucleasa III para digerir la plantilla, primero a 37°C durante 60 min, a continuación a 65°C durante 20 min. Finalmente, 2 µL de cada reacción (en total 63 reacciones) fueron reunidos y unificados y 0,3 µL fueron electroporados en células ER2738 electro-competentes para la secuenciación.

Preparación de fagos que expresan scFv para su uso en ELISA

Los ScFvs pueden ser expresados sobre la superficie de una partícula de fago. Para preparar fagos que expresan scFv Sobre su superficie, unas placas de 96 cavidades profundas que contenían 1 mL de medio 2X TY con glucosa al 2%/100 µg/mL de ampicilina recibieron inoculaciones con $0,5^{-1}$ µL de lotes de glicerol de trabajo (a razón de un clon por cavidad), utilizándose el instrumento QPix™2 Colony picker (Molecular Devices, Sunnyvale CA) y se cultivó a 37°C (900 rpm) durante aproximadamente 4 horas. Seguidamente, 5 µL de una dilución 1:29 de fago helper ($8,3 \times 10^{13}$ pfu) se añadieron y las placas fueron sometidas e incubación durante otros 30 minutos a 37°C sin agitación, y a continuación durante una hora a 300 rpm. Las

placas fueron sometidas a centrifugación y el medio fue reemplazado con una kanamicina/no glucosa que contenía media (2X TY con 50 μg/mL de kanamicina y 100 μg/mL de ampicilina). Las placas fueron cultivadas durante la noche a 25°C (900 rpm), y los fagos fueron cosechados en el material sobrenadante después de la centrifugación.

ELISA para medir la ligación de las proteínas scFv a P-cadherin humano-Fc.

Una proteína P-cadherina-ECD1-3-Fc o una proteína del control negativo fueron aplicadas como recubrimiento durante la noche a 4°C sobre placas Nunc Maxisorp® de 96 cavidades (Thermo Fisher Scientific, Madison, CT) con una concentración de 2 μg/mL en PBS+ Ca^{2+} y Mg^{2+}. Las placas fueron lavadas tres veces utilizándose PBS + Ca^{2+} y Mg^{2+} y fueron bloqueadas durante una hora a temperatura ambiente en leche al 3%/PBS + Ca^{2+} y Mg^{2+}. Las muestras de fago fueron preparadas como anteriormente descrito y se añadieron a las placas bloqueadas durante una hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas tres veces con PBS + Ca^{2+} y Mg^{2+} antes de la adición de anticuerpo secundario (anti M13-HRP 1:2000, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Las placas fueron sometidas a incubación durante otra hora adicional a temperatura ambiente y lavadas seis veces con PBS + Ca^{2+} y Mg^{2+}. Se desarrolló una señal utilizando TMB (SurModics, Eden Prairie, MN), se detuvo la reacción con H_2SO_4 y se leyó la absorción a 450 nm en un instrumento Lector de Placas de EnVision® (Perkin Elmer, Waltham, MA).

Evaluación de la ligación a P-cadherina humana

La ligación de los preparados de fago de mutantes anti-P-cadherina scFv 153 alanina a la proteína P-cadherina-Fc humana fue ensayada mediante ELISA. Los datos fueron graficados como señal de ligación total (OD450) y como un porcentaje en comparación con el clon genitor. Seguidamente se calculó un puntaje Z sobre la base de la desviación estándar de la ligación porcentual del clon 153. Los datos para este ensayo se han presentado en las Tablas 46 y 47.

Los resultados indican una buena expresión de scFv sobre los fagos y demuestran una actividad de ligación prevista del clon 153. Determinados residuos de CDR son considerados importantes por cuanto la mutación a Ala incide de manera negativa sobre la ligación a la P-cadherina humana y tiene un puntaje Z-inferior a -1. Determinado residuos de CDR son considerados moderadamente importantes por cuanto su mutación en Ala arrojó como resultado un puntaje Z entre -0,2 y -1,0. Estos resultados sugieren que $H_{1,8}$, $H_{2,5}$, $H_{3,1}$, $H_{3,7}$ y $L_{3,3}$ son Importantes AA para la ligación a la P-cadherina humana, mientras que $H_{2,6}$, $H_{2,16}$, $H_{3,5}$, $H_{3,9}$, $L_{1,8}$, $L_{2,2}$, $L_{2,3}$, $L_{3,2}$ y $L_{3,2}$ son

moderadamente importantes para la ligación.

Tabla 46. Ligación de mutantes de -P-cadherina clon 153 alanina.

CDR-VH	Secuencia genitora	Ligación P-cadherina humana-Fc (OD450)	% de ligación del clon #153 a la P-cadherina humana-Fc	Puntaje de Z
H1,1-Ala	G	1,79	135	0,7
H1,2-Ala	Y	2,36	179	1,7
H1,3-Ala	T	2,30	174	1,6
H1,4-Ala	F	2,33	177	1,6
H1,5-Ala	T	2,05	155	1,2
H1,6-Ala	S	1,97	149	1,0
H1,7-Ala	Y	1,71	129	0,6
H1,8-Ala	G	0,36	27	-1,5
H1,9-Ala	I	2,21	167	1,4
H1,10-Ala	S	2,13	161	1,3
H2,1-Ala	W	1,37	103	0,1
H2,2-Ala	I	2,20	166	1,4
H2,3-Ala	S	1,83	138	0,8
H2,4-Ala	A			
H2,5-Ala	Y	0,45	34	-1,4
H2,6-Ala	N	1,06	80	-0,4
H2,7-Ala	G	1,50	114	0,3
H2,8-Ala	N	2,14	162	1,3
H2,9-Ala	T	2,03	154	1,1
H2,10-Ala	N	2,27	172	1,5
H2,11-Ala	Y	2,15	163	1,3
H2,12-Ala	A			
H2,13-Ala	Q	2,01	152	1,1
H2,14-Ala	K	1,54	117	0,4
H2,15-Ala	L	1,34	101	0,0
H2,16-Ala	Q	0,90	68	-0,7
H2,17-Ala	G	2,14	162	1,3
H3,1-Ala	I	0,17	13	-1,8
H3,2-Ala	D	2,22	168	1,4
H3,3-Ala	T	2,26	171	1,5
H3,4-Ala	A			
H3,5-Ala	N	0,77	58	-0,9
H3,6-Ala	A			
H3,7-Ala	F	0,31	23	-1,6
H3,8-Ala	G	1,36	103	0,1
H3,9-Ala	I	0,80	61	-0,8
P-cad 153	-	1,32	100	0,0

Tabla 47. Ligación de mutantes anti-P-cadherina 153 alanina.

CDR-VL	Secuencia genitora	Ligación P-cadherina humana Fc	% de ligación del clon #153 a la P-cadherina -Fc	Puntaje de Z
L1,1-Ala	S	2,19	166	1,4
L1,2-Ala	G	1,28	97	-0,1
L1,3-Ala	S	2,19	165	1,4
L1,4-Ala	S	2,31	175	1,6
L1,5-Ala	S	1,70	129	0,6
L1,6-Ala	N	1,16	88	-0,3
L1,7-Ala	I	1,42	108	0,2
L1,8-Ala	G	1,00	75	-0,5
L1,9-Ala	N	1,71	129	0,6
L1,10-Ala	N	1,81	137	0,8
L1,11-Ala	Y	1,84	139	0,8
L1,12-Ala	V	2,29	173	1,6

L1,13-Ala	S	2,26	171	1,5
L2,1-Ala	D	1,45	110	0,2
L2,2-Ala	N	1,35	102	0,0
L2,3-Ala	N	0,98	74	-0,5
L2,4-Ala	K	2,13	161	1,3
L2,5-Ala	R	2,25	170	1,5
L2,6-Ala	P	2,28	172	1,5
L2,7-Ala	S	2,16	163	1,3
L3,1-Ala	G	2,02	153	1,1
L3,2-Ala	T	0,81	61	-0,8
L3,3-Ala	W	0,18	14	-1,8
L3,4-Ala	D	0,92	70	-0,6
L3,5-Ala	S	2,16	163	1,3
L3,6-Ala	S	2,29	173	1,5
L3,7-Ala	L	2,29	173	1,6
L3,8-Ala	S	2,28	173	1,5
L3,9-Ala	G	2,19	166	1,4
L3,10-Ala	V	1,86	141	0,9
L3,11-Ala	V	1,38	104	0,1
P-cad 153	-	1,32	100	0,0

Los datos de escaneo de la alanina y la información estructural (Ejemplo 15) provistos en la presente sugieren que un número importante de residuos de CDR en la anti-P-cadherina scFv 153 podrían ser sustituidos sin afectar de manera significativa la ligación a antígeno. Por lo tanto, se llevaron a cabo análisis adicionales para determinar cuáles residuos de CDR podrían ser sustituidos sin impactar de manera significativa sobre la ligación con P-cadherina. Las Tablas 48-65 muestran la estabilidad Delta Delta G (DDG) prevista para cada posición para lo cual se utilizó el algoritmo de predicción de la estabilidad de Discovery Studio 4,0. El puntaje de estabilidad (DDG) indica el efecto predicho de la mutación sobre la estabilidad de la proteína.

Tabla 48. Residuos VH CDR1 alternativos (DDG <=1,0 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
H1,1	G	R, Q, I, L,C, F, T, G, V, W, M, Y, N, E, P, K, H, D, S, o A
H1,2	Y	H, R, C, Q, Y, I, F, K, M, V, L, N, o T
H1,3	T	N, C, R, V, L, T, I, S, K, Q, M, W, A, F, Y, H, o D
H1,4	F	F o Y
H1,5	T	W, R, I, C, K, Y, M, V, F, T, S, L, Q, E, A, N, H, D, o G
H1,6	S	R, I, M, N, Y, C, H, Q, L, K, F, V, T, E, A, S, D, W, o G
H1,7	Y	K, R, L, H, F, Q, N, C, Y, M, I, T, V, o A
H1,8	G	P, R, F, W, H, C, Y, I, M, K, G, S, Q, A, L, N, T, o D
H1,9	I	Y, F, K, I, W, o L
H1,10	S	R, C, L, N, S, V, T, o A

Tabla 49 Residuos VH CD1 alternativos (DDG <= 0,5 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
H1,1	G	R, Q, I, L, C, F, T, G, V, W, M, Y, N, o E
H1,2	Y	H, R, C, Q, Y, I, F, K, M, V, o L
H1,3	T	N, C, R, V, L, T, I, S, K, Q, o M

H1,4	F	F o Y
H1,5	T	W, R, I, C, K, Y, M, V, F, T, S, L, Q, E, A, N, o H
H1,6	S	R, I, M, N, Y, C, H, Q, L, K, F, V, T, E, A, S, D, o W
H1,7	Y	K, R, L, H, F, Q, N, C, Y, M, I, o T
H1,8	G	P, R, F, W, H, C, Y, I, M, K, G, S, Q, A, L, o N
H1,9	I	Y, F, K, I, W, o L
H1,10	S	R, C, L, N, S, V, o T

Tabla 50. Residuos VH CDR1 alternativos (DDG <= 0 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
H1,1	G	R, Q, ,I, L, C, F, T, o G
H1,2	Y	H, R, C, Q, o Y
H1,3	T	N, C, R, V, L, o T
H1,4	F	F
H1,5	T	W, R, ,I, C, K, Y, M, V, F, o T
H1,6	S	R, I, M, N, Y, C, H, Q, L, K, F, V, T, E, A, o S
H1,7	Y	K, R, L, H, F, Q, N, C, o Y
H1,8	G	P, R, F, W, H, C, Y, I, M, K, o G
H1,9	I	Y, F, K, o I
H1,10	S	R, C, L, N, o S

Tabla 51. Residuos VH CDR2 alternativos (DDG <= 1,0 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
H2,1	W	W
H2,2	I	W, F, Y, I, V, H, L, o Q
H2,3	S	W, F, L, R, C, H, T, N, Y, Q, K, A, I, V, S, M, E, o D
H2,4	A	I, Y, V, Q, F, H, K, C, N, T, E, L, M, D, P, S, A, o W
H2,5	Y	C, P, T, S, L, V, M, F,W, Q, K, G, I, A, N, H, E, D, Y, R
H2,6	N	I, Q, W, V, C, L, K,E ,T, M, F, Y, R, S, A, N, H, D, o G
H2,7	G	G, C, L, N, W, F, S, Y, T, D, I, o M
H2,8	N	Q, C, I, Y, W, L, T, V, K, M, H, F, S, R, A, E, N, D, o G
H2,9	T	F, L, V, W, H, C, Y, K, I, Q, R, T, M, N, A, S, o D
H2,10	N	R, W, K, F, C, T, L, Y, N, Q, V, H, M, A, S, o D
H2,11	Y	L, F, W, N, Y, H, K, R, I, M, V, C, Q, o E
H2,12	A	W, F, I, Y, L, R, V, M, H, N, C, Q, K, T, D, E, A, o S
H2,13	Q	P, R, Q, C, T, I, W, F, K, L, Y, S, V, M, D, o H
H2,14	K	W, C, I, F, T, R, Y, L, Q, S, V, D, N, M, K, A, H, E, o G
H2,15	L	W, I, L, V , F, K, R, H, Y, o M
H2,16	Q	W, F, C, T, L, R, N, Q, A, S, M, K, E, H, Y, o G
H2,17	G	P, G, T, M, C, E, o V

Tabla 52. Residuos VH CDR2 alternativos (DDG <= 0,5 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
H2,1	W	W
H2,2	I	W, F, Y, I, o V
H2,3	S	W, F, L, R, C, H, T, N, Y, Q, K, A, I, V, S, M, o E
H2,4	A	I, Y, V, Q, F, H, K, C, N, T, E, L, M, D, P, S, A, o W
H2,5	Y	C, P, T, S, L, V, M, F, W, Q, K, G, I, A, N, H, E, D, o Y
H2,6	N	I, Q, W, V, C, L, K, E, T, M, F, Y, R, S, A, N, H, D, o G
H2,7	G	G, C, L, o N
H2,8	N	Q, C, I, Y, W, L, T, V, K, M, H, F, S, R, A, E, N, o D
H2,9	T	F, L, V, W, H, C, Y, K, I, Q, R, T, M, N, A, o S
H2,10	N	R, W, K, F, C, T, L, Y, N, Q, V, H, M, A, o S
H2,11	Y	L, F, W, N, Y, H, K, R, I, M, o V

H2,12	A	W, F, I, Y, L, R, V, M, H, N, C, Q, K, T, D, E, A, o S
H2,13	Q	P, R, Q, C, T, I, W, F, K, L, Y, o S
H2,14	K	W, C, I, F, T, R, Y, L, Q, S, V, D, N, M, K, A, H, o E
H2,15	L	W, I, L, V, F, K, R, o H
H2,16	Q	W, F, C, T, L, R, N, Q, A, S, M, o K
H2,17	G	P o G

Tabla 53. Residuos VH CDR2 alternativos (DDG <= 0 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
H2,1	W	W
H2,2	I	W, F, Y, o I
H2,3	S	W, F, L, R, C, H, T, N, Y, Q, K, A, I, V, o S
H2,4	A	I, Y, V, Q, F, H, K, C, N, T, E, L, M, D, P, S, o A
H2,5	Y	C, P, T, S, L, V, M, F, W, Q, K, G, I, A, N, H, E, D, o Y
H2,6	N	I, Q, W, V, C, L, K, E, T, M, F, Y, R, S, A, N, o H
H2,7	G	G
H2,8	N	Q, C, I, Y, W, L, T, V, K, M, H, F, S, R, A, E, o N
H2,9	T	F, L, V, W, H, C, Y, K, I, Q, R, o T
H2,10	N	R, W, K, F, C, T, L, Y, o N
H2,11	Y	L, F, W, N, o Y
H2,12	A	W, F, I, Y, L, R, V, M, H, N, C, Q, K, T, D, E, o A
H2,13	Q	P, R, o Q
H2,14	K	W, C, I, F, T, R, Y, L, Q, S, V, D, N, M, o K
H2,15	L	W, I, o L
H2,16	Q	W, F, C, T, L, R, N, o Q
H2,17	G	P o G

Tabla 54. Residuos VH CDR3 alternativos (DDG <= 1,0 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
H3,1	I	F, Y, I, R, W, o L
H3,2	D	F, I, C, M, W, Q, L, H, V, N, R, T, D, S, E, A, Y, o K
H3,3	T	H, W, C, I, S, L, T, F, Q, Y, V, A, M, K, N, G, D, o E
H3,4	A	Y, I, M, W, R, H, V, F, C, K, N, Q, L, D, T, S, A, o E
H3,5	N	W, L, V, I, P, C, Y, M, H, T, N, F, D, A, o S
H3,6	A	F, W, C, H, N, R, Y, L, A, Q, E, M, T, I, S, K, o D
H3,7	F	Y, F, o W
H3,8	G	W, F, Y, I, L, Q, R, H, M, N, V, C, T, K, E, D, S, A, P, o G
H3,9	I	W, Y, F, R, I, L, C, V, H, N, K, T, Q, M, o D

Tabla 55. Residuos VH CDR3 alternativos (DDG <= 0,5 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
H3,1	I	F, Y, I, o R
H3,2	D	F, I, C, M, W, Q, L, H, V, N, R, T, D, S, E, A, Y, o K
H3,3	T	H, W, C, I, S, L, T, F, Q, Y, V, A, o M
H3,4	A	Y, I, M, W, R, H, V, F, C, K, N, Q, L, D, T, S, A, o E
H3,5	N	W, L, V, I, P, C, Y, M, H, T, N, F, o D
H3,6	A	F, W, C, H, N, R, Y, L, A, Q, E, M, T, I, o S
H3,7	F	Y, F, o W
H3,8	G	W, F, Y, I, L, Q, R, H, M, N, V, C, T, K, E, D, S, A, P, o G
H3,9	I	W, Y, F, R, I, L, C, V, H, N, o K

Tabla 56. Residuos VH CDR3 alternativos (DDG <= 0 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
H3,1	I	F, Y, I, o R
H3,2	D	F, I, C, M, W, Q, L, H, V, N, R, T, o D
H3,3	T	H, W, C, I, S, L, o T
H3,4	A	Y, I, M, W, R, H, V, F, C, K, N, Q, L, D, T, S, o A
H3,5	N	W, L, V, I, P, C, Y, M, H, T, o N
H3,6	A	F, W, C, H, N, R, Y, L, o A
H3,7	F	Y o F
H3,8	G	W, F, Y, I, L, Q, R, H, M, N, V, C, T, K, E, D, S, A, P, o G
H3,9	I	W, Y, F, R, o I

Tabla 57. Residuos VL CDR1 alternativos (DDG <= 1,0 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
L1,1	S	W, C, I, F, Y, T, H, N, M, Q, K, L, S, A, V, D, R, E, o G
L1,2	G	G
L1,3	S	R, Q, Y, L, K, F, M, N, W, C, I, T, V, S, E, A, H, D, o G
L1,4	S	C, L, F, S, I, T, W, N, Y, V, D, A, K, Q, M, H, o R
L1,5	S	F, C, I, T, V, N, H, L, Y, S, R, Q, W, A, M, E, K, o D
L1,6	N	L, Q, F, M, N, C, K, H, o T
L1,7	I	I, Q, H, F, L, o V
L1,8	G	R, Q, L, T, G, C, E, D, M, Y, o S
L1,9	N	C, W, I, L, F, R, V, T, K, N, S, M, Q, Y, E, A, H, o D
L1,10	N	Q, F, N, L, C, Y, H, R, W, o M
L1,11	Y	M, H, K, V, Q, L, Y, C, I, N, F, T, S, E, o W
L1,12	V	I, N, V, L, C, o T
L1,13	S	W, R, F, K, I, H, V, C, T, L, N, M, Q, Y, S, A, D, o E

Tabla 58. Residuos VL CDR1 alternativos (DDG <= 0,5 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
L1,1	S	W, C, I, F, Y, T, H, N, M, Q, K, L, S, A, V, D, R, o E
L1,2	G	G
L1,3	S	R, Q, Y, L, K, F, M, N, W, C, I, T, V, S, E, A, H, o D
L1,4	S	C, L, F, S, I, T, W, N, Y, o V
L1,5	S	F, C, I, T, V, N, H, L, Y, S, R, Q, W, A, M, o E
L1,6	N	L, Q, F, M, N, o C
L1,7	I	I, Q, o H
L1,8	G	R, Q, L, T, G, o C
L1,9	N	C, W, I, L, F, R, V, T, K, N, S, M, Q, Y, E, A, H, o D
L1,10	N	Q, F, N, L, o C
L1,11	Y	M, H, K, V, Q, L, Y, C, o I
L1,12	V	I, N, o V
L1,13	S	W, R, F, K, I, H, V, C, T, L, N, M, Q, Y, S, o A

Tabla 59. Residuos VL CDR1 alternativos (DDG <= 0 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
L1,1	S	W, C, I, F, Y, T, H, N, M, Q, K, L, o S
L1,2	G	G
L1,3	S	R, Q, Y, L, K, F, M, N, W, C, I, T, V, o S
L1,4	S	C, L, F, o S
L1,5	S	F, C, I, T, V, N, H, L, Y, o S
L1,6	N	L, Q, F, M, o N
L1,7	I	I
L1,8	G	R, Q, L, T, o G

L1,9	N	C, W, I, L, F, R, V, T, K, o N
L1,10	N	Q, F, o N
L1,11	Y	M, H, K, V, Q, L, o Y
L1,12	V	I, N, o V
L1,13	S	W, R, F, K, I, H, V, C, T, L, N, M, Q, Y, o S

Tabla 60. Residuos VL CDR2 alternativos (DDG <= 1,0 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
L2,1	D	I, L, V, F, Y, W, C, R, Q, N, M, H, E, T, P, K, D, S, A, o G
L2,2	N	W, L, F, I, C, N, R, V, Q, Y, E, D, H, o M
L2,3	N	C, Q, L, F, Y, W, E, R, M, H, A, N, T, K, D, S, I, V, o G
L2,4	K	R, K, I, L, C, Q, V, W, Y, M, F, o H
L2,5	R	R, Q, L, W, K, o H
L2,6	P	R, K, I, W, F, L, Q, C, M, Y, H, V, N, T, A, E, S, P, o D
L2,7	S	C, L, I, T, S, K, M, R, V, F, P, A, W, Q, D, N, G, o Y

Tabla 61. Residuos VL CDR2 alternativos (DDG <= 0,5 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
L2,1	D	I, L, V, F, Y, W, C, R, Q, N, M, H, E, T, P, K, D, S, o A
L2,2	N	W, L, F, I, C, N, R, V, o Q
L2,3	N	C, Q, L, F, Y, W, E, R, M, H, A, N, T, K, D, S, o I
L2,4	K	R, K, I, L, C, Q, o V
L2,5	R	R o Q
L2,6	P	R, K, I, W, F, L, Q, C, M, Y, H, V, N, T, A, E, S, o P
L2,7	S	C, L, I, T, S, K, M, R, V, F, P, o A

Tabla 62. Residuos VL CDR2 alternativos (DDG <= 0 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
L2,1	D	I, L, V, F, Y, W, C, R, Q, N, M, H, E, T, P, K, o D
L2,2	N	W, L, F, I, C, o N
L2,3	N	C, Q, L, F, Y, W, E, R, M, H, A, o N
L2,4	K	R o K
L2,5	R	R
L2,6	P	R, K, I, W, F, L, Q, C, M, Y, H, V, N, T, A, E, S, o P
L2,7	S	C, L, I, T, o S

Tabla 63. Residuos VL CDR3 alternativos (DDG <= 1,0 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
L3,1	G	W, R, Y, F, L, N, Q, C, M, I, H, T, A, D, E, S, K, V, o G
L3,2	T	N, C, V, T, S, o A
L3,3	W	W
L3,4	D	F, N, D, E, H, Q, Y, R, o W
L3,5	S	T, I, R, L, C, F, Y, W, Q, M, H, E, N, V, S, D, K, o A
L3,6	S	I, H, C, M, N, L, V, Q, E, S, T, A, K, D, F, Y, G, R, o W
L3,7	L	L, C, R, I, H, Q, E, T, V, M, K, F, o Y
L3,8	S	W, L, C, F, T, N, V, Y, I, M, H, Q, S, K, E, D, A, R, o G
L3,9	G	L, Y, Q, F, H, I, C, R, M, N, D, W, E, K, T, V, A, S, o G
L3,10	V	I, F, K, L, H, Y, M, V, Q, W, T, N, o C
L3,11	V	Q, W, R, F, T, C, Y, V, E, L, N, I, K, o M

Tabla 64. Residuos VL CDR3 alternativos (DDG <= 0,5 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
L3,1	G	W, R, Y, F, L, N, Q, C, M, I, H, T, A, D, E, S, K, V, o G
L3,2	T	N, C, V, o T
L3,3	W	W
L3,4	D	F, N, D, o E
L3,5	S	T, I, R, L, C, F, Y, W, Q, M, H, E, N, V, S, D, K, o A
L3,6	S	I, H, C, M, N, L, V, Q, E, S, T, A, o K
L3,7	L	L, C, R, I, H, Q, E, T, o V
L3,8	S	W, L, C, F, T, N, V, Y, I, M, H, Q, S, K, E, D, A, o R
L3,9	G	L, Y, Q, F, H, I, C, R, M, N, D, W, E, K, T, V, A, S, o G
L3,10	V	I, F, K, L, H, Y, M, V, Q, W, o T
L3,11	V	Q, W, R, F, T, C, Y, V, E, L, o N

Tabla 65. Residuos VL CDR3 alternativos (DDG <= 0 kcal/mol)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (columna 3)
L3,1	G	W, R, Y, F, L, N, Q, C, M, I, H, T, A, D, E, S, K, V, o G
L3,2	T	N, C, V, o T
L3,3	W	W
L3,4	D	F, N, D, o E
L3,5	S	T, I, R, L, C, F, Y, W, Q, M, H, E, N, V, o S
L3,6	S	I, H, C, M, N, L, V, Q, E, o S
L3,7	L	L
L3,8	S	W, L, C, F, T, N, V, Y, I, M, H, Q, o S
L3,9	G	L, Y, Q, F, H, I, C, R, M, N, D, W, E, K, T, V, A, S, o G
L3,10	V	I, F, K, L, H, Y, M, o V
L3,11	V	Q, W, R, F, T, C, Y, o V

Las Tablas 66-71 muestran los resultados del análisis Abysis de secuencias humanas en cada posición de CDR. Cada posición de CDR de anti-P-cadherina 153 fue comparada con el CDR correspondiente de la secuencia de anticuerpo humana tomada de una base de datos. Esta base de datos combinaba todas las secuencias humanas tomadas de diversas bases de datos que incluyen: el PDB, la base de datos de Kabat, la base de datos de IMGT, la VBASE, y la base de datos interna de Pfizer. Las secuencia de anticuerpo humanas en esta base de datos fueron numeradas según Kabat mediante Abysis, y las frecuencias de los residuos de CDR fueron calculadas utilizándose solamente los CDR con la misma longitud que las que se encuentran en el clon 153 de P-cadherina. Las Tablas 66-71 muestran aminoácidos alternativos en cada posición en donde los residuos enumerados se hallan presentes en por lo menos un 5 a 10% de las secuencias humanas. Los residuos de P-cadherina 153 también se hallan incluidos en las columnas 3 y 4 aun si no recaen en una categoría superior al 5% 10%.

Tabla 66. Residuos VH CDR1 alternativos (Abysis)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (>5% de secuencias humanas) (columna 3)	Residuos alternativos (>10% de secuencias humanas) (columna 4)
H1,1	G	G	G
H1,2	Y	Y, F, o G	Y, F, o G
H1,3	T	T o S	T o S
H1,4	F	F	F
H1,5	T	S o T	S o T
H1,6	S	S, G, N, o D	S, G, o N
H1,7	Y	Y	Y
H1,8	G	A, Y, W, o G	A, Y, W, o G
H1,9	I	M, I, o W	M o I
H1,10	S	S, H, N, o G	S, H, N, o G

Tabla 67. Residuos VH CDR2 alternativos (Abysis)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (>5% de secuencias humanas) (columna 3)	Residuos alternativos (>10% de secuencias humanas) (columna 4)
H2,1	W	W, I, G, A, V, R, o S	W, I, G, o A
H2,2	I	I	I
H2,3	S	S, N, Y, o I	S, N, Y, o I
H2,4	A	P, G, Y, A, o S	P, G, o A
H2,5	Y	S, N, D, G, I, o Y	S, N, D, G, I, o Y
H2,6	N	G, S, D, N, o F	G, S, D, o N
H2,7	G	G o S	G o S
H2,8	N	N, S, T, D, G, o Y	N, S, T, D, o G
H2,9	T	T, K, A, o I	T, K, o A
H2,10	N	Y, N, R, S, o G	Y, N, o R
H2,11	Y	Y	Y
H2,12	A	A o S	A o S
H2,13	Q	Q, D, o P	Q, D, o P
H2,14	K	S o K	S o K
H2,15	L	F, V, o L	F, V, o L
H2,16	Q	Q o K	Q o K
H2,17	G	G	G

Tabla 68. Residuos VH CDR3 alternativos (Abysis)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (>5% de secuencias humanas) (columna 3)	Residuos alternativos (>10% de secuencias humanas) (columna 4)
H3,1	I	G, D, P, V, F, S, o I	G, D, o I
H3,2	D	G, R, I, L, V, S, Q, o D	G, R, o D
H3,3	T	G, R, V, S, L, K, Y, o T	G o T
H3,4	A	G, I, Y, R, F, L, S, o A	G, I, Y, R, o A
H3,5	N	G, S, Y, D, V, E, R, o N	G, S, Y, o N
H3,6	A	G, A, R, Y, o P	G, A, o R
H3,8	F	F, M, P, o L	F, M, o P
H3,9	G	D, E, o G	D, E, o G
H3,10	I	Y, V, o I	Y, V, o I

Tabla 69. Residuos VL CDR1 alternativos (Abysis)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (>5% de secuencias humanas) (columna 3)	Residuos alternativos (>10% de secuencias humanas) (columna 4)
L1,1	S	S o T	S
L1,2	G	G o R	G
L1,3	S	S	S
L1,4	S	S, R, o T	S
L1,5	S	S o G	S
L1,6	N	N o S	N
L1,7	I	I o V	I
L1,8	G	G o A	G
L1,9	N	S, N, o G	S o N
L1,10	N	N o Y	N
L1,11	Y	Y, T, o S	Y o T
L1,12	V	V	V
L1,13	S	S, N, Y, o Q	S, N, o Y

Tabla 70. Residuos VL CDR2 alternativos (Abysis)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (>5% de secuencias humanas) (columna 3)	Residuos alternativos (>10% de secuencias humanas) (columna 4)
L2,1	D	D, G, E, A, S, o R	D, G, E, A, o S
L2,2	N	A, N, V, D, o T	A, N, o V
L2,3	N	S, N, o T	S o N
L2,4	K	N, S, Q, K, o T	N, S, Q, o K
L2,5	R	R o L	R o L
L2,6	P	P, A, Q, o E	P, A, o Q
L2,7	S	S o T	S o T

Tabla 71. Residuos VL CDR3 alternativos (Abysis)

Posición de CDR (columna 1)	Residuo de P-cad 153 (columna 2)	Residuos alternativos (>5% de secuencias humanas) (columna 3)	Residuos alternativos (>10% de secuencias humanas) (columna 4)
L3,1	G	A, Q, G, o S	A, Q, G, o S
L3,2	T	S, A, T, o V	S, A, o T
L3,3	W	W, Y, o R	W o Y
L3,4	D	D, A, o T	D
L3,5	S	S, D, o G	S o D
L3,6	S	S	S
L3,7	L	L, S, o G	L o S
L3,8	S	S, N, T, R, o D	S, N, o T
L3,9	G	G, A, H, o L	G o A
L3,10	V	V, W, Y, G, o P	V, W, o Y
L3,11	V	V, L, o I	V

La divulgación de cada patente, solicitud de patente, y publicación mencionadas en la presente se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Si bien esta invención ha sido divulgada haciendo referencia a formas de realización específicas, es evidente que otras formas de realización y variaciones de

esta invención podrán ser concebidas por otras personas con pericia en la especialidad sin apartarse del espíritu verdadero y alcances de la invención. Las reivindicaciones adjuntas incluyen la totalidad de dichas formas de realización y sus variaciones equivalentes