

DIACUERPOS MONOVALENTES BIESPECÍFICOS QUE SON CAPACES DE UNIR
CD19 Y CD3, Y USOS DE LOS MISMOS

Referencia Cruzada a Solicitudes Relacionadas:

5 **[0001]** Esta Solicitud reclama prioridad para la Solicitud de
Patente Provisional de los Estados Unidos No. de Serie 62/055,695
(presentada el 26 de septiembre de 2014; pendiente), cuya
aplicación se incorpora en la presente para referencia en su
totalidad.

10

Referencia al Listado de Secuencia:

[0002] Esta solicitud incluye uno o más Listado de Secuencias
de conformidad con 37 C.F.R. 1.821 et seq., los cuales se
describen en un medio compatible por computadora (nombre de
15 archivo: 1301_0116PCT_Sequence_Listing_ST25.txt, creado el 18
de septiembre de 2015, y tiene un tamaños de 47,329 bytes), cuyo
archive se incorpora para referencia en su totalidad.

Campo de la Invención:

20 **[0003]** La presente invención se dirige a diacuerpos
monovalentes biespecíficos que comprenden dos cadenas de
polipéptidos y que poseen un sitio de unión específico para un
epítopo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítopo
de CD3 (es decir, un "Diacuerpo monovalente biespecífico de CD19
25 x CD13"). De mayor preferencia, tales diacuerpos monovalentes

biespecíficos de CD19 x CD3 se componen de tres cadenas de polipéptidos y poseen un sitio de unión específico para un epítipo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítipo de CD3 y adicionalmente comprenden un dominio Fc de inmunoglobulina (es decir, un "Diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3"). Los diacuerpos monovalentes biespecíficos y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención son capaces de una unión simultánea a CD19 y CD3. La invención se dirige a composiciones farmacéuticas que contienen tales diacuerpos monovalentes biespecíficos o tales diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos. La invención se dirige adicionalmente a métodos para el uso de tales diacuerpos en el tratamiento de enfermedades, en particular neoplasias hematológicas.

15 **Antecedentes de la Invención:**

A. CD19

[0004] La CD19 (antígeno B4 de superficie de linfocitos B, número de acceso Genbank M28170) es una glicoproteína de transmembrana tipo I de 95 kDa de la superfamilia de inmunoglobulina (Stamenkovic, I. et al. (1988) "*CD19, The Earliest Differentiation Antigen Of The B Cell Lineage, Bears Three Extracellular Immunoglobulin-Like Domains And An Epstein-Barr Virus-Related Cytoplasmic Tail*", J. Exper. Med. 168(3):1205-1210; Tedder, T.F. et al. (1989) "*Isolation Of cDNAs Encoding The CD19 Antigen Of Human And Mouse B Lymphocytes. A New*

Member Of The Immunoglobulin Superfamily", J. Immunol. 143(2):712-717; Zhou, L.J. et al. (1991) "*Structure And Domain Organization Of The CD19 Antigen Of Human, Mouse, And Guinea Pig B Lymphocytes. Conservation Of The Extensive Cytoplasmic Domain*", J. Immunol. 147(4):1424-1432). CD19 se expresa en células dendríticas foliculares y en todas las células B de las células pre-B tempranas desde el momento de la redistribución de la cadena pesada hasta la etapa de células plasmática, cuando la expresión de CD19 se desregula. CD19 no se expresa en células madre hematopoyéticas o en células B antes de la etapa de células pro-B (Sato et al. (1995) "*The CD19 Signal Transduction Molecule Is A Response Regulator Of B-Lymphocyte Differentiation*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11558-62; Loken et al. (1987) "*Flow Cytometric Analysis of Human Bone Marrow. II. Normal B Lymphocyte Development*", Blood, 70:1316- 1324; Wang et al. (2012) "*CD19: A Biomarker For B Cell Development, Lymphoma Diagnosis And Therapy*", Exp. Hematol. and Oncol. 1:36).

[0005] La CD19 es un componente del complejo de receptor de células B (BCR), y es un regulador positivo de Señalización de células B que modula el umbral para la activación de células B e inmunidad humoral. La CD19 interactúa con CD21 (receptor de fragmentos CR2, C3d) y CD81 a través de dos dominios similares a Ig tipo C2 extracelulares, que forman junto con CD225 el complejo BCR. El dominio intracelular de CD19 se implica en cascadas de señalización intracelular, principalmente pero no

exclusivamente en señales de regulación corriente abajo del BCR y CD22 (Mei et al. (2012) "*Rationale of Anti-CD19 Immunotherapy: An Option To Target Autoreactive Plasma Cells In Autoimmunity*", Arthritis Res and Ther. 14 (Suppl. 5):S1; Wang et al. (2012) "*CD19: A Biomarker For B Cell Development, Lymphoma Diagnosis And Therapy*", Exp. Hematol. and Oncol. 1:36); Del Nagro et al. (2005) "*CD19 Function in Central and Peripheral B-Cell Development*", Immunologic Res. 31:119-131).

[0006] Diversas propiedades de CD19 sugieren su posible potencial como un objetivo para inmunoterapia. La CD19 es uno de los antígenos más ubicuamente expresados en el linaje de células B y se expresa en >95% de neoplasias de células B, incluyendo leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), y linfoma de no Hodking (NHL) (Wilson, K. et al. (2010) "*Flow Minimal Residual Disease Monitoring Of Candidate Leukemic Stem Cells Defined By The Immunophenotype, CD34+CD38lowCD19+ In B-Lineage Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*", Haematologica 95(4):679-683; Maloney, D.G. et al. (1997) "*IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy In Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma*", Blood 90(6):2188-2195; Vose, J.M. (1998) "*Current Approaches To The Management Of Non-Hodgkin's Lymphoma*", Semin. Oncol. 25(4):483-491; Nagorsen, D. et al. (2012) "*Blinatumomab: A Historical Perspective*", Pharmacol. Ther. 136(3):334-342; Topp, M.S. et al. (2011) "*Targeted Therapy With The T-Cell-Engaging*"

Antibody Blinatumomab Of Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease In B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results In High Response Rate And Prolonged Leukemia-Free Survival", J. Clin Oncol. 2011 Jun
 5 *20;29(18):2493-2498; Nadler, et al. (1983) "B4, A Human B Lymphocyte-Associated Antigen Expressed On Normal, Mitogen-Activated, And Malignant B Lymphocytes". J. Immunol.;131:244-250; Ginaldi et al. (1998) "Levels Of Expression Of CD19 And CD20 In Chronic B Cell Leukaemias", J.*
 10 *Clin. Pathol. 51:364-369; Anderson et al. (1984) "Expression of Human B Cell-Associated Antigens on Leukemias and Lymphomas: A Model of Human B Cell Differentiation", Blood 63:1424-1433). La*
CD19 se expresa en pocas o ningún otro tipo celular y también no se expresa en células plasmáticas terminalmente diferenciadas,
 15 *lo que por lo tanto puede salvarse por las terapias dirigidas con CD19. La CD19 no se queda en la circulación, y rápidamente puede internalizarse (Ma et al. (2002) "Radioimmunotherapy For Model B Cell Malignancies Using 90Y-Labeled Anti-CD19 And Anti-CD20 Monoclonal Antibodies", Leukemia 16:60-66; Raufi et al. (2013)*
 20 *"Targeting CD19 in B-cell lymphoma: emerging role of SAR3419", Cancer Management Res 3:225-233). De forma notable, la expresión de CD19 se mantiene en linfomas de células B que se vuelven resistentes a la terapia anti-CD20 (Davis et al. (1999) "Therapy of B-cell Lymphoma With Anti-CD20 Antibodies Can Result In The*
 25 *Loss Of CD20 Antigen Expression." Clin Cancer Res, 5:611-615,*

1999). La CD19 también se ha sugerido como un objetivo para tratar enfermedades autoinmunes (Tedder (2009) "*CD19: A Promising B Cell Target For Rheumatoid Arthritis*", Nat. Rev. Rheumatol. 5:572-577).

5 **[0007]** Las neoplasias de células B representan un grupo heterogéneo de trastornos con características y comportamiento clínico ampliamente variables. Históricamente, muchos pacientes con enfermedad sintomática recibieron una combinación de agentes genotóxicos sin reacción cruzada con el intento de lograr una
10 remisión duradera y en algunos casos, una cura. Aunque efectivos, muchos regímenes tradicionales también se asocian con toxicidades considerable agudas y a largo plazo (véase, por ejemplo, Stock, W. et al. (2013) "*Dose Intensification Of Daunorubicin And Cytarabine During Treatment Of Adult Acute*
15 *Lymphoblastic Leukemia: Results Of Cancer And Leukemia Group B Study 19802*", Cancer. 2013 Jan 1;119(1):90-98). El anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab se utiliza para el tratamiento de muchos trastornos de células B, donde pueden emplearse en combinación con agentes "estándar de cuidado" o emplearse como
20 un solo agente (Fowler et al. (2013) "*Developing Novel Strategies to Target B-Cell Malignancies*", Targeted Pathways, B-Cell Lymphoma en: ASCO Educational Book, pp. 366-372; Bargou, R. et al. (2008) "*Tumor Regression In Cancer Patients By Very Low Doses Of A T Cell-Engaging Antibody*", Science 321(5891):974-977;
25 Thomas, D.A. et al. (2010) "*Chemoimmunotherapy With A Modified*

Hyper-CVAD And Rituximab Regimen Improves Outcome In De Novo Philadelphia Chromosome-Negative Precursor B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia", J. Clin. Oncol. 28(24):3880-3889). A pesar de los resultados clínicos alentadores, el retratamiento

5 de pacientes con linfomas indolentes con un solo agente de rituximab se ha asociado con una tasa de respuesta de solo 40%, lo que sugiere que la Resistencia puede ocurrir en neoplasias de células B como una respuesta a la exposición prolongada a rituximab (Smith (2003) "Rituximab (Monoclonal Anti-CD20

10 Antibody): Mechanisms Of Action And Resistance." Oncogene 22:7359-68; Davis et al. (1999) "Therapy of B-cell Lymphoma With Anti-CD20 Antibodies Can Result In The Loss Of CD20 Antigen Expression", Clin Cancer Res, 5:611-615, 1999; Gabrilovich, D. et al. (2003) "Tumor Escape From Immune Response: Mechanisms And

15 Targets Of Activity", Curr. Drug Targets 4(7):525-536). Se ha reportado que las líneas celulares resistentes a Rituximab generadas in vitro muestran una Resistencia cruzada contra múltiples agentes quimioterapéuticos (Czuczman et al. (2008) "Acquirement Of Rituximab Resistance In Lymphoma Cell Lines Is

20 Associated With Both Global CD20 Gene And Protein Down-Regulation Regulated At The Pretranscriptional And Post-transcriptional Levels", Clin Cancer Res. 14:1561-1570; Olejniczak et al. (2008) "Acquired Resistance To Rituximab Is Associated With Chemotherapy Resistance Resulting From Decreased Bax And Bak

25 Expression", Clin Cancer Res. 14:1550-1560).

[0008] Los antígenos de superficie de linfoma de células B adicionales dirigidos por anticuerpos terapéuticos incluyen CD19 (Hoelzer (2013) "*Targeted Therapy With Monoclonal Antibodies In Acute Lymphoblastic Leukemia*", Curr. Opin. Oncol. 25:701-706; Hammer (2012) "*CD19 As An Attractive Target For Antibody-Based Therapy*", mAbs 4:571-577). Sin embargo, a pesar de las actividades anti-linfoma potentes asociadas con la internalización del complejo y liberación intracelular del fármaco libre, se reportaron por varios anticuerpos

10 biespecíficos de anticuerpos anti-CD19 que tienen una porción de unión a anti-CD19 o conjugados de fármaco anticuerpo (ADC) que los efectos anti-tumor de estos anticuerpos anti-CD19 o ADC fueron variables, lo que sugiere que las propiedades específicas de anticuerpo, tales como unión a epítipo, la capacidad de inducir

15 la oligomerización de CD19 o diferencias en señalización intracelular afectan sus potencias (Du et al. (2008) "*Differential Cellular Internalization Of Anti-CD19 And -CD22 Immunotoxins Results In Different Cytotoxic Activity*", Cancer Res. 68:6300-6305; Press et al. (1994) "*Retention Of*

20 *B-Cell-Specific Monoclonal Antibodies By Human Lymphoma Cells. Blood*", 83:1390-1397; Szatrowski et al. (2003) "*Lineage Specific Treatment Of Adult Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia In First Remission With Anti-B4-Blocked Ricin Or High-Dose Cytarabine: Cancer And Leukemia Group B Study 9311*", Cancer

25 97:1471-1480; Frankel et al. (2013) "*Targeting T Cells To Tumor*

Cells Using Bispecific Antibodies", Curr. Opin. Chem. Biol. 17:385-392).

[0009] Por lo tanto, a pesar de las mejoras en supervivencia de muchos, la mayoría de los pacientes que sufren neoplasias de células B continúan recayendo después de la quimioinmunoterapia estándar y más de 15,000 pacientes aún morirán anualmente en los Estados Unidos de cánceres de células B. Por consiguiente, los tratamientos con nuevos compuestos no cruzados resistentes se necesitan para mejorar aún más la supervivencia de los pacientes.

10

B. CD3

[0010] CD3 es un co-receptor de células T compuesto de cuatro cadenas distintas (Wucherpfennig, K.W. et al. (2010) "*Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling*", Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2(4):a005140; páginas 1-14; Chetty, R. et al. (1994) "*CD3: Structure, Function, And Role Of Immunostaining In Clinical Practice*", J. Pathol. 173(4):303-307; Guy, C.S. et al. (2009) "*Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex*", Immunol. Rev. 232(1):7-21).

20

[0011] En mamíferos, el complejo contiene una cadena de CD3 γ , una cadena de CD3 δ , y dos cadenas de CD3 ϵ . Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como receptor de células T (TCR) para generar una señal de activación en linfocitos T (Smith-Garvin, J.E. et al. (2009) "*T Cell Activation*", Annu. Rev. Immunol.

25

27:591-619). En ausencia de CD3, los TCR no se ensamblan apropiadamente y se degradan (Thomas, S. et al. (2010) "*Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer*", Immunology 129(2):170-177). Se encontró que CD3 se

5 enlaza a las membranas de todas las células T maduras, y virtualmente no en otro tipo de células (véase, Janeway, C.A. et al. (2005) En: IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE", 6th ed. Garland Science Publishing, NY, pp. 214- 216; Sun, Z. J. et al. (2001) "*Mechanisms Contributing To T Cell Receptor*

10 *Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 ϵ : γ Heterodimer*", Cell 105(7):913-923; Kuhns, M.S. et al. (2006) "*Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex*", Immunity. 2006 Feb; 24(2):133-139).

15 **[0012]** El componente de señalización de CD3 ϵ invariante del complejo receptor de células T (TCR) en células T, se ha utilizado como un objetivo para forzar la formación de una sinapsis inmunológicamente las células T y células de tumor. El co-acoplamiento de CD3 y el antígeno de tumor active las células

20 T, desencadena la lisis de células de tumor que expresan el antígeno de tumor (Baeuerle et al. (2011) "*Bispecific T Cell Engager For Cancer Therapy*", En: BISPECIFIC ANTIBODIES, Kontermann, R.E. (Ed.) Springer-Verlag; 2011:273-287). Este procedimiento permite que los anticuerpos biespecíficos interactúen

25 globalmente con el compartimento de células T con alta

especificidad para células de tumor y es ampliamente aplicable para una amplia disposición de antígenos de tumor de superficie celular.

5 **C. Anticuerpos y otras moléculas de unión**

[0013] Los Anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina capaces de unirse específicas a un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se utiliza en la presente, el término abarca no sólo anticuerpos monoclonales o policlonales intactos, sino también mutantes de los mismos, variantes que ocurren naturalmente, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo con un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, y anticuerpos quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida.

20 [0014] La capacidad de un anticuerpo intacto sin modificar (por ejemplo, una IgG) para unir un epítipo de un antígeno depende de la presencia de Dominios Variables en las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina (es decir, los Dominios de VL y VH, respectivamente). La interacción de una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo y, en particular,

la interacción de sus Dominios de VL y VH forman uno de los sitios de unión a epítipo del anticuerpo. En contraste, el constructo scFv comprende un Dominio de VL y VH de un anticuerpo contenido en una sola cadena de polipéptido en donde los Dominios se separan por un enlazador flexible de longitud suficiente para permitir el autoensamble de los dos Dominios en un sitio de unión a epítipo funcional. Donde el autoensamble de los Dominios de VL y VH se imposibilita debido a un enlazador de longitud insuficiente (menos de alrededor de 12 residuos de aminoácidos), dos de los constructos scFv interactúan entre sí para formar una molécula bivalente en la cual la VL de una cadena se asocia con la VH de la otra (revisado en Marvin *et al.* (2005) "*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658).

[0015] Además de sus usos conocidos en diagnóstico, se ha mostrado que los anticuerpos son útiles como agentes terapéuticos. En las últimas pocas décadas, se ha observado un renacimiento de interés en el potencial terapéutico de anticuerpos, y los anticuerpos se han vuelto una de las clases líderes de fármacos derivados de la biotecnología (Chan, C.E. *et al.* (2009) "*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases*", Singapore Med. J. 50(7):663-666). Se han aprobado casi 200 fármacos a base de anticuerpos para su uso o se encuentran bajo desarrollo.

[0016] Los anticuerpos naturales son capaces de unirse no sólo

a una especie de epítopo (es decir, monoespecífico), aunque pueden unirse a múltiples copias de esa especie (es decir, mostrando una bivalencia o multivalencia). Se ha desarrollado una amplia variedad de formatos de anticuerpos biespecíficos recombina-
5 tes (véase, por ejemplo, Publicaciones de PCT Nos. WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968), la mayoría de las cuales utilizan péptidos enlazadores ya sea para fusionar el núcleo de anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) o además una proteína de unión (por ejemplo, scFv) o fusionar por
10 ejemplo, dos fragmentos Fab o scFv. Típicamente, tales procedimientos implican compromisos y compensaciones. Por ejemplo, las Publicaciones de PCT Nos. WO 2013/174873, WO 2011/133886 y WO 2010/136172 describen que el uso de enlazadores puede provocar problemas en ajustes terapéuticos, y enseña un
15 anticuerpo triespecífico en el cual los Dominios de CL y CH1 se cambian desde sus posiciones naturales respectivas y los Dominios de VL y VH han sido diversificados (WO 2008/027236; WO 2010/108127) para permitirles unirse a más de un antígeno. Por lo tanto, las moléculas descritas en estos documentos con
20 especificidad de unión comercial para la capacidad de unir especies de antígeno adicionales. Las Publicaciones de PCT Nos. WO 2013/163427 y WO 2013/119903 describen modificar el Dominio de CH2 para que contenga un aducto de proteína de fusión que comprende un dominio de unión. El documento indica que el Dominio
25 de CH2 probablemente sólo juega un mínimo papel en la función

efectora por mediación. Las Publicaciones de PCT Nos. WO 2010/028797, WO2010028796 y WO 2010/028795 describen anticuerpos recombinantes cuyas Regiones Fc han sido remplazadas con los Dominios de VL y VH adicionales, para formar moléculas de unión

5 trivalentes. Las Publicaciones de PCT Nos. WO 2003/025018 y WO2003012069 describen diacuerpos recombinantes cuyas cadenas individuales contienen dominios de scFv. Las Publicaciones de PCT No. WO 2013/006544 describen moléculas de Fab multivalentes que se sintetizan como una sola cadena de polipéptido y después se

10 exponen a proteólisis para producir estructuras heterodiméricas. Por lo tanto, las moléculas descritas en estos documentos comercializan toda o cierta de la capacidad de la función efectora por mediación para la capacidad de unir especies de antígeno adicionales. Las Publicaciones de PCT Nos. WO 2014/022540, WO

15 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 y WO 1991/003493 describen agregar Dominios de unión adicionales o grupos funcionales a un anticuerpo o una porción de anticuerpo (por ejemplo, agregar un diacuerpo a la cadena ligera del anticuerpo,

20 o agregar Dominios de VL y VH adicionales a las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, o agregar una proteína de fusión heteróloga o encadenar múltiples Dominios de Fab entre sí). Por lo tanto, las moléculas descritas en estos documentos comercializan estructuras de anticuerpos naturales para la

25 capacidad de unir especies de antígeno adicionales.

[0017] La técnica ha observado aún más la capacidad para producir diacuerpos que difieren de tales anticuerpos naturales en que son capaces de unir dos o más especies de epítipo diferentes (es decir, muestran biespecificidad o multiespecificidad además de bivalencia o multivalencia) (véase, por ejemplo, Holliger et al. (1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Holliger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Protein Eng Des Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Resumen 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer

Therapy", Cancer Res. 69(12):4941-4944).

[0018] El diseño de un diacuerpo se basa en los fragmentos de región variable de una sola cadena (scFv). Tales moléculas se fabrican al enlazar regiones variables de cadena ligera y/o variable al utilizar un péptido corto de unión. Bird et al. (1988) (*"Single-Chain Antigen-Binding Proteins"*, Science 242:423-426) describen ejemplos de péptidos de unión que cierra aproximadamente 3.5 nm entre el término carboxi de una región variable y el término amino de la otra región variable. Se han diseñado y utilizado enlazadores de otras secuencias (Bird et al. (1988) *"Single-Chain Antigen-Binding Proteins"*, Science 242:423-426). A su vez, los enlazadores pueden modificarse para funciones adicionales, tales como el anexo de fármacos o anexo a soportes sólidos. Las variantes de una sola cadena pueden producirse ya sea de forma recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, puede utilizarse un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, puede introducirse un plásmido adecuado que contiene un polinucleótido que codifica el scFv en una células huésped adecuada, ya sea eucariótica tal como células de levadura, de planta, de insecto o de mamífero, o procariótica , tal como E. coli. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden fabricarse por manipulaciones de rutina tales como ligadura de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse utilizando técnicas de purificación de proteínas estándar conocidas en la

técnica.

[0019] La Patente de los Estados Unidos No. 7,585,952 y la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2010-0173978 conciernen a moléculas de scFv que son inmunoespecíficas para
 5 ErbB2. Han sido descritos activadores de células T biespecíficos ("BiTEs"), un tipo de molécula de scFv (WO 05/061547; Baeuerle, P et al. (2008) "*BiTE: A New Class Of Antibodies That Recruit T Cells*", *Drugs of the Future* 33: 137-147; Bargou, et al. 2008) "*Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T*
 10 *Cell-Engaging Antibody*", *Science* 321: 974-977). Tales moléculas se componen de una molécula de polipéptido de una sola cadena que tiene dos dominios de unión al antígeno, uno de los cuales se une inmunoespecíficamente a un epítipo de CD3 y el segundo del cual se une específicamente a un antígeno presente en la superficie
 15 de una célula objetivo.

[0020] Se han descrito moléculas biespecíficas que se dirigen a ambos de CD19 y CD3. Blinatumomab, un BiTE de scFv-CD19 x CD3 biespecífico se encuentra en pruebas clínicas y se reporta por tener una afinidad para CD3 de ~100 nM, y una afinidad para CD19
 20 de ~1 nM. El Blinatumomab muestra una EC50 para lisis en células objetivo in vitro de ~10-100 pg/ml (Frankel et al. (2013) "*Targeting T Cells To Tumor Cells Using Bispecific Antibodies*", *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17:385-392). También se ha desarrollado un redireccionamiento de afinidad dual de CD19 x CD3 biespecífico
 25 (DART) (Moore et al. (2011) "*Application Of Dual Affinity*

Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", Blood 117(17):4542-4551). Comparado con el BiTE de scFv-CD19 x CD3 biespecífico, esta molécula mostró afinidades de unión similares pero tuvo una EC50 menor para lisis

5 de células objetivo in vitro de ~0.5 a 5 pg/mL y mostró de forma consistente altos niveles de lisis máxima tipo AFM11, también se ha descrito un tandab biespecífico de un CD19 x CD3. El AFM11 se reporta por tener una EC50 para lisis de células objetivo in vitro de ~0.5 to 5 pg/ml (Zhukovsky et al. (2013) "A CD19/CD3 Bispecific

10 *Tandab, AFM11, Recruits T Cells To Potently and Safely Kill CD19+ Tumor Cells*", J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; abstr 3068)). Ninguno de estos constructos incluye un dominio Fc.

[0021] A pesar de tal éxito, la producción de diacuerpos no monoespecíficos heterodiméricos funcionales estables, también

15 puede optimizarse por la consideración y colocación cuidadosa de residuos de cisteína en una o más de las cadenas de polipéptidos. Tales diacuerpos optimizados pueden producirse en un rendimiento más alto y con mayor actividad que los diacuerpos no optimizados. Por lo tanto, la presente invención se dirige al problema de

20 proporcionar polipéptidos que se diseñan y optimizan particularmente para formar diacuerpos heterodiméricos. La invención resuelve este problema a través de la condición de los diacuerpos de CD19 x CD3 optimizados ejemplares.

[0022] La presente invención se dirige a diacuerpos monovalentes biespecíficos que comprenden dos cadenas de polipéptidos y que poseen un sitio de unión específico para un epítipo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítipo de CD3 (es decir, un "Diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD13"). De mayor preferencia, tales diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 se componen de tres cadenas de polipéptidos y poseen un sitio de unión específico para un epítipo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítipo de CD3 y adicionalmente comprenden un dominio Fc de inmunoglobulina (es decir, un "Diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3"). Los diacuerpos monovalentes biespecíficos y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención son capaces de una unión simultánea a CD19 y CD3. La invención se dirige a composiciones farmacéuticas que contienen tales diacuerpos monovalentes biespecíficos o tales diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos. La invención se dirige adicionalmente a métodos para el uso de tales diacuerpos en el tratamiento de enfermedades, en particular neoplasias hematológicas.

[0023] Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la invención por lo tanto comprenden al menos dos cadenas de polipéptidos diferentes. Las cadenas de polipéptidos de tales diacuerpos se asocian entre sí de una manera heterodimérica para formar un sitio de unión específico para un epítipo de CD19 y un sitio de unión

específico para un epítipo de CD3. Un diacuerpo monovalente
 biespecífico de CD19 x CD13 o diacuerpo Fc monovalente
 biespecífico de la presente invención por lo tanto es monovalente
 en que es capaz de unirse sólo a una copia de un epítipo de CD19
 5 y sólo a una copia e un epítipo de CD3, pero es biespecífico en
 que un solo diacuerpo es capaz de unirse de forma simultánea al
 epítipo de CD19 y al epítipo de CD3. Cada una de las cadenas de
 polipéptidos de los diacuerpos se enlaza de forma covalente a otra
 cadena de polipéptidos del diacuerpo, por ejemplo por enlaces
 10 disulfuro de residuos de cisteína ubicados dentro de tal cadena
 de polipéptidos, para formar un complejo enlazado de forma
 covalente. En modalidades particulares, los diacuerpos de la
 presente invención además tienen un dominio Fc de inmunoglobulina
 y/o un -Dominio de unión a Albúmina para extender su vida media
 15 in vivo.

[0024] En detalle, la invención proporciona un Diacuerpo Fc
 monovalente biespecífico de CD19 x CD3 capaz de unirse específico
 a CD19 y a CD3, en donde el diacuerpo comprende una primera,
 segunda y tercera cadenas de polipéptidos, en donde las cadenas
 20 de polipéptidos forman un complejo enlazado de forma covalente,
 y en donde:

I. la primera cadena de polipéptidos comprende, en
 dirección N-terminal a C-terminal:

A. un Dominio IA, que comprende

25 (1) un sub-Dominio (IA1), que comprende un

Dominio VL capaz de unir a ya sea CD19 (VL_{CD19})

o CD3 (VL_{CD3}); y

(2) un sub-Dominio (IA2), que comprende un

Dominio VH capaz de unir a ya sea CD19 (VH_{CD19})

5 o CD3 (VH_{CD3});

en donde los Subdominios IA1 e IA2 se separan entre

sí por un enlazador de polipéptidos, y son

cualquiera de

(a) VL_{CD19} y VH_{CD3}; o

10 (b) VL_{CD3} y VH_{CD19};

B. un Dominio IB, que comprende un Dominio promotor del Heterodímeros cargado, en donde el Dominio IB se separa del Dominio 1A por un enlazador de polipéptidos;

15 C. un Dominio IC, que comprende un Dominio CH2-CH3 de un anticuerpo; y

II. la segunda cadena de polipéptidos comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:

A. un Dominio IIA, que comprende

20 (1) un sub-Dominio (IIA1), que comprende un Dominio VL capaz de unir a ya sea CD19 (VL_{CD19}) o CD3 (VL_{CD3}); y

(2) un sub-Dominio (IIA2), que comprende un Dominio VH capaz de unir a ya sea CD19 (VH_{CD19})

25 o CD3 (VH_{CD3});

en donde los Subdominios IIA1 y IIA2 se separan entre sí por un enlazador de polipéptidos, y son:

(a) VLCD19 y VHCD3, si los Subdominios IA1 e IA2 son VLCD3 y VHCD19; o

5 (b) VLCD3 y VHCD19, si los Subdominios IA1 e IA2 son VLCD19 y VHCD3;

B. un Dominio IIB, que comprende un Dominio promotor del Heterodímeros cargado, en donde el Dominio IIB se separa del Dominio IIA por un enlazador de polipéptidos, y en donde el Dominio promotor del Heterodímeros cargado of el Dominio IB y el Dominio promotor del Heterodímeros cargado of el Dominio IIB tiene cargas opuestas; y

10

III. la tercera cadena de polipéptidos comprende, en dirección N-terminal a C-terminal un Dominio IIIC que comprenden un Dominio de CH2-CH3 de un anticuerpo;

15

en donde los dominios de VLCD19 y de VHCD19 forman un dominio de unión de CD9, y los dominios de VLCD3 y de VHCD3 forman un dominio de unión de CD3; y los Dominios de CH2-CH3 de la primera y tercera cadenas de polipéptidos forman un dominio Fc capaz de unirse a un receptor Fc, que de este modo forma el Diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD13.

20

[0025] La invención proporciona adicionalmente la modalidad del Diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3 indicado en lo anterior, en donde:

25

(A) cada uno de los Dominios IB e IIB comprende un residuo de cisteína que se une de forma covalente la primera cadena de polipéptidos a la segunda cadena de polipéptidos mediante un enlace disulfuro; y

5 (B) cada uno de los Dominios IC e IIIC comprende un residuo de cisteína que se une de forma covalente la primera cadena de polipéptidos a la tercera cadena de polipéptidos mediante un enlace disulfuro.

[0026] La invención proporciona adicionalmente la modalidad
10 de cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 indicados en lo anterior, en donde la VLCD19 tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:17** y la VHCD19 tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:21**.

[0027] La invención adicionalmente proporciona la modalidad
15 de cualquiera de diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 indicados en lo anterior, en donde la VLCD3 tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:25** y la VHCD3 tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:29**.

[0028] La invención adicionalmente proporciona la modalidad
20 de cualquiera de diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 indicados en lo anterior, en donde el Dominio de CH2-CH3 del Dominio IC tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:15** y el Dominio de CH2-CH3 del Dominio IIIC tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:16**.

25 **[0029]** La invención adicionalmente proporciona la modalidad

de cualquiera de diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 indicados en lo anterior, en donde

(A) el Dominio promotor del Heterodímeros cargado del Dominio IB tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:10**

5 y el Dominio promotor del Heterodímeros cargado del Dominio IIB tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:11**; o

(B) el Dominio promotor del Heterodímeros cargado del Dominio IB tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:12**

y el Dominio promotor del Heterodímeros cargado del Dominio IIB
10 tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:13**.

[0030] La invención adicionalmente proporciona la modalidad de cualquiera de diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 indicados en lo anterior, en donde:

(A) la primera cadena de polipéptidos tiene la secuencia
15 de aminoácidos de la **SEQ ID NO:35**;

(B) la segunda cadena de polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:37**; y

(C) la tercera cadena de polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:39**.

20 **[0031]** La invención adicionalmente proporciona la modalidad de cualquiera de diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 indicados en lo anterior, lo cual es capaz de reacción cruzada con CD19 y CD3 tanto de humano como de primate.

[0032] La invención proporciona adicionalmente cualquiera de
25 los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3

descritos en lo anterior para su uso como un farmacéutico.

[0033] La invención proporciona adicionalmente cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 descritos en lo anterior para su uso en el tratamiento de una enfermedad o padecimiento asociado con o caracterizado por la expresión de CD19, o en un método de tratar una enfermedad o padecimiento caracterizado por la expresión de CD19, particularmente en donde la enfermedad o padecimiento asociado con o caracterizado por la expresión de CD19 es cáncer, y más particularmente, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste de: leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), incluyendo crisis blástica de CML y oncogen de Abelson asociado con CML (translocación de Bcr-ABL), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia linfoblástica B aguda (B-ALL), linfoma de células B grandes y difusas (DLBCL), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica (CLL), incluyendo síndrome de Richter o transformación de Richter de CLL, leucemia de células pilosas (HCL), neoplasma de células dendríticas plasmacitoides blásticas (BPDCN), linfomas de no Hodgkin (NHL), incluyendo leucemia de células de manto (MCL), y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica, y linfoma de Burkitt.

[0034] La invención proporciona adicionalmente un complejo de polipéptidos asociado de forma covalente, en donde el complejo de polipéptidos comprende una primera cadena de polipéptidos y

una segunda cadena de polipéptidos, en donde:

(A) la primera cadena de polipéptidos comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:2** enlazada a un Dominio promotor de Heterodímeros que tiene

5 la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:12**; y

(B) la segunda cadena de polipéptidos comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:2** enlazada a un Dominio promotor de Heterodímeros que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:13**;

10 en donde los Dominios promotores de Heterodímeros de la primera cadena de polipéptidos y los Dominios promotores de Heterodímeros de la segunda cadena de polipéptidos se enlazan de forma covalente entre sí mediante un enlace disulfuro.

[0035] La invención proporciona adicionalmente una
15 composición farmacéutica que comprende cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 descritos en lo anterior y un portador fisiológicamente aceptable. La invención adicionalmente concierne con el uso de tal composición farmacéutica en el tratamiento de una enfermedad o padecimiento
20 asociado con o caracterizado por la expresión de CD19, particularmente en donde la enfermedad o padecimiento asociado con o caracterizado por la expresión de CD19 es cáncer, y más particularmente, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste de: leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), incluyendo crisis blástica de CML y oncogen de
25

Abelson asociado con CML (translocación de Bcr-ABL), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia linfoblástica B aguda (B-ALL), linfoma de células B grandes y difusas (DLBCL), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica (CLL), incluyendo
5 síndrome de Richter o transformación de Richter de CLL, leucemia de células pilosas (HCL), neoplasma de células dendríticas plasmacitoides blásticas (BPDCN), linfomas de no Hodgkin (NHL), incluyendo leucemia de células de manto (MCL), y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis
10 sistémica, y linfoma de Burkitt.

[0036] Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención de preferencia son capaces de mostrar una afinidad de unión similar al CD3 soluble de macaco cinomolgo y
15 de humano y una diferencia de 10 veces en la unión a CD19, cuando se analiza por tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR) (BIAcore), o cuando se analiza por citometría de flujo utilizando una Población de células T reguladas por CD4+ y CD8+ y una población de células B reguladas por CD20+.

20 **[0037]** Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención de preferencia son capaces de mediar el exterminio redirigido de células de tumor objetivo utilizando células T de humano en un ensayo que emplea cualquiera de las 3
25 líneas celulares de linfoma B objetivo, Raji/GF (Linfoma de

Burkitt), HBL-2 (linfoma de células del manto), o Jeko-1 (linfoma de células del manto), y utilizar células T primarias purificadas como células efectoras. En tal ensayo, el exterminio de células de tumor objetivo se mide utilizando un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa en el cual la actividad enzimática de LDH liberada de las células después de la muerte celular se mide cuantitativamente, o por medio de un ensayo de luciferasa en el cual la luz relativa de luciferasa (RLU) es la lectura para indicar una viabilidad relativa de células objetivo Raji/GF, que han sido diseñadas para expresar tanto la proteína verde fluorescente (GFP) como los genes reporteros de luciferasa. La EC50 observada de tal exterminio redirigido es alrededor de 5 pM o menos, alrededor de 3 pM o menos, alrededor de 1 pM o menos, alrededor de 0.5 pM o menos, alrededor de 0.3 pM o menos, alrededor de 0.2 pM o menos, alrededor de 0.1 pM o menos, alrededor de 0.05 pM o menos, alrededor de 0.04 pM o menos, alrededor de 0.03 pM o menos, alrededor de 0.02 pM o menos o alrededor de 0.01 pM o menos.

[0038] Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención de preferencia son capaces de mediar la citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de macaco cinomolgo y de humano para provocar una agotamiento de células B de CD20+ dependientes de la dosis tanto en sistemas celulares como en una relación de célula efectora a

célula T de 2:1, 3:1, 4: 1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 ó 9:1. La EC50 observada de agotamiento de células B de CD20+ de humano fue alrededor de 7 pM o menos, alrededor de 5 pM o menos, alrededor de 3 pM o menos, alrededor de 1 pM o menos, alrededor de 0.5 pM o menos, alrededor de 0.3 pM o menos, alrededor de 0.2 pM o menos, alrededor de 0.1 pM o menos, alrededor de 0.05 pM o menos, alrededor de 0.04 pM o menos, alrededor de 0.03 pM o menos, alrededor de 0.02 pM o menos o alrededor de 0.01 pM o menos. La EC50 observada de agotamiento de células B de CD20+ de cinomolgo fue alrededor de 1000 pM o menos, alrededor de 900 pM o menos, alrededor de 800 pM o menos, alrededor de 500 pM o menos, alrededor de 300 pM o menos, alrededor de 100 pM o menos, alrededor de 50 pM o menos, alrededor de 20 pM o menos, alrededor de 10 pM o menos, alrededor de 5 pM o menos, alrededor de 2 pM o menos, o alrededor de 1 pM o menos, tal que la relación de agotamiento de células B autólogas de humano a agotamiento de células B de macaco cinomolgo fue alrededor de 500:1 o menos, alrededor de 300:1 o menos, alrededor de 100:1 o menos, alrededor de 50:1 o menos, alrededor de 20:1 o menos o alrededor de 10:1 o menos.

[0039] Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención de preferencia son capaces de mediar la liberación de citoquinas (por ejemplo, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, e IL-10 y especialmente IFN- γ y TNF- α) por los PBMC de humano y macaco cinomolgo. Tal liberación es alrededor de 5000 pg/mL o

menos, alrededor de 4000 pg/mL o menos, alrededor de 3000 pg/mL o menos, alrededor de 2000 pg/mL o menos, alrededor de 1000 pg/mL o menos, alrededor de 500 pg/mL o menos, alrededor de 2000 pg/mL o menos, o alrededor de 100 pg/mL o menos. La EC50 media de la liberación de citoquina a partir de los PBMC de humano es
5 alrededor de 100 pM o menos, alrededor de 90 pM o menos, alrededor de 80 pM o menos, alrededor de 50 pM o menos, alrededor de 30 pM o menos, alrededor de 20 pM o menos, alrededor de 10 pM o menos, o alrededor de 5 pM o menos. La EC50 media de la liberación de
10 citoquina de los PBMC de macaco cinomolgo es alrededor de 3000 pM o menos, alrededor de 2000 pM o menos, alrededor de 1000 pM o menos, alrededor de 500 pM o menos, alrededor de 300 pM o menos, alrededor de 200 pM o menos, alrededor de 100 pM o menos, o alrededor de 50 pM o menos.

15 **[0040]** Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención de preferencia son capaces de mediar la inhibición del crecimiento de tumor de linfoma de células B de humano en una co-mezcla de xenoinjerto en la cual tales moléculas
20 se introducen en ratones NOD/SCID junto con HBL-2 (un linfoma humano de células del manto) o células de tumor de Raji (Linfoma de Burkitt) y células T de humano activadas en una relación de 1:5. De preferencia, tales diacuerpos son capaces de inhibir el crecimiento de tumor cuando se proporcionan a una concentración
25 mayor de 100 µg/ml, a una concentración de alrededor de 100 µg/kg,

a una concentración de alrededor de 80 µg/kg, a una concentración de alrededor de 50 µg/kg, a una concentración de alrededor de 20 µg/kg, a una concentración de alrededor de 10 µg/kg, a una concentración de alrededor de 5 µg/kg, a una concentración de
5 alrededor de 2 µg/kg, a una concentración de alrededor de 1 µg/kg, a una concentración de alrededor de 0.5 µg/kg, a una concentración de alrededor de 0.2 µg/kg, a una concentración de alrededor de 0.1 µg/kg, a una concentración de alrededor de 0.05 µg/kg, a una concentración de alrededor de 0.02 µg/kg, a una concentración de
10 alrededor de 0.01 µg/kg, o a una concentración de alrededor de 0.005 µg/kg, a una concentración menor de 0.005 µg/kg.

[0041] Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención de preferencia son capaces de mostrar una
15 actividad anti-tumor en un modelo de xenoinjerto de HBL-2 (linfoma humano de células del manto) en ratones NSG B2m-/- hembras, implantados intradérmicamente (ID) con células de tumor HBL-2 en el Día 0 seguido por inyección intraperitoneal (IP) de los PBMC en el Día 4 y administración del diacuerpo en el Día 17,
20 para provocar una reducción en el volumen de tumor de alrededor de 10%, alrededor de 20%, alrededor de 40%, alrededor de 60%, alrededor de 80%, alrededor de 90% o más de 90%.

[0042] Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la
25 presente invención de preferencia son capaces de mostrar vidas

medias prolongadas desde su introducción en un recipiente humano o animal no humano. Tales vidas medias pueden medirse al introducir el diacuerpo en un ratón transgénico con FcRn de humano (Patente de los Estados Unidos No. 6,992,234 y 7,358,416; Haraya, K. (2014) "*Application Of Human FcRn Transgenic Mice As A Pharmacokinetic Screening Tool Of Monoclonal Antibody*", Xenobiotica 2014 Jul 17:1-8; Proetzel, G. et al. (2014) "*Humanized FcRn mouse models for evaluating pharmacokinetics of human IgG antibodies*", Methods 65(1):148-153; Stein, C. et al. (2012) "*Clinical Chemistry Of Human FcRn Transgenic Mice*", Mamm. Genome 23(3-4):259-269; Roopenian, D.C. et al. (2010) "*Human FcRn Transgenic Mice For Pharmacokinetic Evaluation Of Therapeutic Antibodies*", Methods Molec. Biol. 602:93-104). La medición se realizó utilizando un ratón B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr} (CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ mouse (Número en existencia 004919), disponible de Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, EUA.

[0043] Para evitar cualquier duda, los diacuerpos de la invención puede mostrar uno, dos, tres, más de tres o todos los atributos funcionales descritos en la presente. Por lo tanto, los diacuerpos de la invención pueden mostrar cualquier combinación de los atributos funcionales descritos en la presente.

[0044] Los diacuerpos de la presente invención pueden ser para su uso como un fármaco. De preferencia, los diacuerpos are para su uso en el tratamiento de una enfermedad o padecimiento asociado con o caracterizado por la expresión de CD19. La

invención también se relaciona con el uso de diacuerpos de la invención en la fabricación de una composición farmacéutica, de preferencia para el tratamiento de una enfermedad o padecimiento asociado con o caracterizado por la expresión de CD19 como se
5 define aún más en la presente.

[0045] La enfermedad o padecimiento asociado con o caracterizado por la expresión de CD19 puede ser una neoplasia de células B (Campo, E. et al. (2011) "*The 2008 WHO Classification Of Lymphoid Neoplasms And Beyond: Evolving Concepts And Practical*
10 *Applications*", Blood 117(19):5019-5032). Por ejemplo, el cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste de: leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), incluyendo crisis blástica de CML y oncogen de Abelson asociado con CML (translocación de Bcr-ABL), síndrome mielodisplásico (MDS),
15 leucemia linfoblástica B aguda (B-ALL), linfoma de células B grandes y difusas (DLBCL), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica (CLL), incluyendo síndrome de Richter o transformación de Richter de CLL, leucemia de células pilosas (HCL), neoplasma de células dendríticas plasmacitoides blásticas
20 (BPDCN), linfomas de no Hodgkin (NHL), incluyendo leucemia de células de manto (MCL), y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica, y linfoma de Burkitt.

[0046] La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los
25 diacuerpos descritos en lo anterior y un portador

fisiológicamente aceptable. La invención particularmente pertenece a tal composición farmacéutica en donde la enfermedad o padecimiento tratado es refractario al tratamiento con rituximab.

5 **[0047]** La invención proporciona adicionalmente un uso de la composición farmacéutica descrita en lo anterior en el tratamiento de una enfermedad o padecimiento asociado con o caracterizado por la expresión de CD19.

10 **[0048]** La invención se dirige particularmente a la modalidad de tal uso, en donde la enfermedad o padecimiento asociado con o caracterizado por la expresión de CD19 es una neoplasia de células B (especialmente un cáncer seleccionado del grupo que consiste de: leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), incluyendo crisis blástica de CML y oncogen de

15 Abelson asociado con CML (translocación de Bcr-ABL), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia linfoblástica B aguda (B-ALL), linfoma de células B grandes y difusas (DLBCL), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica (CLL), incluyendo síndrome de Richter o transformación de Richter de CLL, leucemia

20 de células pilosas (HCL), neoplasma de células dendríticas plasmacitoides blásticas (BPDCN), linfomas de no Hodgkin (NHL), incluyendo leucemia de células de manto (MCL), y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica, y linfoma de Burkitt).

25 **[0049]** Términos tales como "alrededor" deben tomarse para

significar dentro de 10%, de mayor preferencia dentro de 5%, del valor especificado, a menos que el contexto se requiera de otro modo.

5 Breve descripción de los Dibujos

[0050] La **Figura 1** ilustra la estructura de una diacuerpo monovalente biespecífico asociado de forma covalente compuesto de dos cadenas de polipéptidos.

[0051] Las **Figuras 2A y 2B** ilustran la estructuras de dos versiones de la primera, segunda y tercera cadenas de polipéptidos de un Diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3 de tres cadenas de la presente invención (Versión 1, **Figura 2A**; Versión 2, **Figura 2B**).

[0052] La **Figura 3** muestra el acoplamiento simultáneo de CD19 y CD3 por DART-A (●). Cualquiera de **DART de control 1** (■) sin **DART de control 2** (▲) fue capaz de unirse a ambos objetivos simultáneamente.

[0053] Las **Figuras 4A-4B** muestran la unión de una Molécula biespecífica de CD19 x CD3 (DART-A) para células B de CD20+ de humano (**Figura 4A**) y macaco cinomolgo (**Figura 4B**).

[0054] Las **Figuras 5A-5B** muestran la unión de la molécula biespecífica de CD19 x CD3 (DART-A) para células T de CD4+ y CD8+ de humano (**Figura 5A**) y macaco cinomolgo (**Figura 5B**).

[0055] Las **Figuras 6A-6F** muestran el exterminio redirigido mediado por (**DART-A**) de la molécula biespecífica de CD19 x CD3

de células objetivo en relación con aquella de **DART de control 1**. Las curvas de dosis-respuesta de citotoxicidad mediada por **DART-A** utilizando células T de humano primarias como células efectoras para líneas celulares objetivo: HBL-2 (**Figura 6A**),
 5 Raji/GF (verde fluorescente) (**Figura 6B**), Jeko-1 (**Figura 6C**), Molm-13 (**Figura 6D**), y Colo205/Luc (**Figura 6F**) con el exterminio de células objetivo medido utilizando el ensayo de LDH. La **Figura 6E** muestra el exterminio de células de Raji/GF cuando se determinó utilizando un ensayo de luciferasa (RLU) para medir las células
 10 viables relativas. Los valores de EC50 para **DART-A** se muestran en cada gráfico para 1 experimento representativo. **DART-A: ▲; DART de control 1: ▼.**

[0056] Las **Figuras 7A-7D** muestran el exterminio redirigido mediado por (**DART-A**) de la molécula biespecífica de CD19 x CD3
 15 de células objetivo Raji/GF en relaciones celulares E:T variantes (10:1 (●), 5:1 (■), y 2.5:1 (▲)). Las curvas de dosis-respuesta de citotoxicidad mediada por **DART-A** (por ciento de citotoxicidad) con células T de humano primarias como células efectoras para células objetivo Raji/GF de CD19+ se determinaron después de 24
 20 horas de incubación (**Figura 7A**) y después de 48 horas de incubación (**Figura 7B**). Las curvas de dosis-respuesta de citotoxicidad mediada por **DART-A** (por ciento de citotoxicidad) con células T de humano primarias como células efectoras para células JIMT-1 CD19-negativas se determinó después de 24 horas
 25 de incubación (**Figura 7C**) y después de 48 horas de incubación

(Figura 7D) que se incluyeron como controles. Se muestran 1 de 3 experimentos representativos, cada uno de los cuales utiliza células T de donadores independientes.

[0057] Las Figuras 8A-8D muestran el exterminio redirigido mediado por (DART-A) de la molécula biespecífica de CD19 x CD3 de células objetivo Raji/GF en relaciones celulares menores de E:T de 2.5:1 (●) o 1:1 (■). Las curvas de dosis-respuesta de citotoxicidad mediada por DART-A (por ciento de citotoxicidad) con células T de humano primarias como células efectoras para células objetivo Raji/GF de CD19+ se determinaron después de 72 horas de incubación (Figura 8A) y después de 96 horas de incubación (Figura 8B). Las curvas de dosis-respuesta de Citotoxicidad mediada por DART-A de CD19 x CD3 biespecífico (por ciento de citotoxicidad) con células T de humano primarias como células efectoras para células JIMT-1 de CD19 negativas se determinó después de 72 horas de incubación (Figura 8C) y después de 96 horas de incubación (Figura 8D) que se incluyeron como controles. Se muestran 1 de 3 experimentos representativos, cada uno de los cuales utiliza células T de donadores independientes.

[0058] Las Figuras 9A-9B muestran el agotamiento de células B autólogas mediadas por (DART-A) de la molécula biespecífica de CD19 x CD3 en los PBMC de macaco cinomolgo o de humano. Las curvas de dosis-respuesta se presentan para el agotamiento de células B autólogas mediadas por DART (DART-A o DART de control 1). Figura 9A: por ciento de células CD20+ de humano después del tratamiento

con PBMC con diversas dosis de **DART-A** o **DART de control 1**. **Figura 9B**: por ciento de células CD20+ de macaco cinomolgo después de tratamiento con PBMC con diversas dosis de **DART-A** o **DART de control 1**. Los valores de EC50 para **DART-A** se muestran en cada gráfico. El por ciento de células CD3+ se analizó en paralelo y se utilizó como un control de referencia interno - no se observaron cambios a ninguna concentración probada. **DART-A: ▲; DART de control 1: ▼.**

[0059] La **Figura 10** muestra el exterminio redirigido mediado por (**DART-A**) de la molécula biespecífica de CD19 x CD3 de células objetivo con los PBMC de macaco cinomolgo a E:T = 30:1. **DART-A: ▲; DART de control 1: ▼.**

[0060] Las Figuras **11A-11C** muestran la liberación de citocinas mediadas por (**DART-A**) de la molécula biespecífica de CD19 x CD3 de células T de humano en presencia de células objetivo. Las células T de humano se trataron con **DART-A** o **DART de control 1** por alrededor de 24 horas en presencia de células objetivo Raji/GF. Los cultivos de supernadante se recolectaron y expusieron a una medición de citocinas a base de ELISA. Se muestra un experimento representativo de 2 utilizando diferentes donadores. **Figura 11A**: liberación de γ -interferón (IFN γ); **Figura 11B**: liberación del factor- α de necrosis de tumor (TNF- α); **Figura 11C**: liberación de Interleucina 2 (IL-2). **DART-A: ▲; DART de control 1: ▼.**

[0061] Las **Figuras 12A-12D** muestran la activación de células

T de humano durante el exterminio celular redirigido por una molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) en relación con aquella de **DART de control 1**. Dosis respuesta de la inducción mediada por **DART-A** de los marcadores de activación celular CD25 (Figuras 12A-12B) y CD69 (Figuras 12C-12D) en células T de humano CD8+ (Figuras 12A y 12C) y CD4+ (Figuras 12B y 12D) utilizando células objetivo Raji/GF. Se muestra un experimento representativo de 2, cada uno de los cuales utilizó células T de diferentes donadores. **DART-A: ▲; DART de control 1: ▼.**

10 [0062] Las Figuras 13A-13D muestran la activación de células T de macaco cinomolgo durante el exterminio celular redirigido por una molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) en relación con aquella de **DART de control 1**. Dosis respuesta de la inducción mediada por **DART-A** de los marcadores de activación celular CD25 (Figuras 13A y 13B) y CD69 (Figuras 13C y 13D) de células T en células T de macaco cinomolgo de CD8+ (Figuras 13A y 13C) y CD4+ (Figuras 13B y 13D) o los PBMC que utilizan células objetivo Raji/GF. Se muestra un experimento representativo utilizando células T. **DART-A: ▲; DART de control 1: ▼.**

20 [0063] Las Figuras 14A-14D muestran que la molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) y DART de control 1 fallan para mediar la activación de células T de humano en presencia de células JIMT1 CD19 negativas. Se presenta una dosis-respuesta de la inducción mediada por **DART-A** de los marcadores de activación de células T CD25 (Figuras 14A y 14B) y CD69 (Figuras 14C y 14D)

en CD8+ (**Figuras 14A y 14C**) y CD4+ (**Figuras 14B y 14D**) del mismo donador como en las **Figuras 12A-12D**. **DART-A: ▲; DART de control 1: ▼.**

[0064] Las **Figuras 15A-15B** muestran los niveles intracelulares de tinción de granzima B (**Figura 15A**) y perforina (**Figura 15B**) en células T de humano CD4+ y CD8+ después de su incubación con células objetivo Raji/GF y **DART-A** o **DART de control 1** a concentraciones variables durante 24 horas a una relación E:T de 10:1.

10 [0065] Las **Figuras 16A y 16B** muestran la proliferación de células T de humano etiquetadas con CFSE por análisis FACS después de co-cultivarlas con células objetivo HBL-2 en una relación E:T de 10:1 en presencia de **DART-A** o **DART de control 1** a 200 ng/mL durante 24 horas (**Figura 16A**) o 72 horas (**Figura 16B**). Se muestran
15 los perfiles de tinción después del co-cultivo con células HBL-2 en presencia de **DART-A** (líneas negras) o en presencia de **DART de control 1** (relleno gris).

[0066] La **Figura 17** muestra la inhibición del crecimiento de tumor por la molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) en
20 ratones implantados con células de tumor HBL-2 en presencia de células T de humano activadas. Ratones hembra (NOD/SCID) inmunodeficientes combinadas con diabéticas no obesas/severas (n = 8/grupo) se implantaron subcutáneamente (SC) con células de tumor HBL-2 + células T de humano activadas en el Día 0 seguidas
25 por tratamiento con un vehículo de control, **DART de control 1**,

o **DART-A** en los Días 0-3 por un total de 4 dosis, administradas IV. Las células T de humano y células HBL-2 se incubaron en una relación de 1:5 (1×10^6 y 5×10^6 células, respectivamente). El volumen de tumor se muestra como media de grupo $\pm$ EEM.

5 **[0067]** La **Figura 18** muestra la inhibición del crecimiento de tumor por la molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) en ratones implantados con células de tumor Raji en presencia de células T de humano activadas. Se implantaron SC ratones hembra NOD/SCID ($n = 8/\text{grupo}$) con células de tumor Raji + células T de humano activadas en el Día 0 seguidas por tratamiento con un
10 vehículo de control, **DART de control 1**, o **DART-A** en los Días 0-3 por un total de 4 dosis administradas IV. Las células T de humano y células Raji se incubaron en una relación de 1:5 (1×10^6 y 5×10^6 células, respectivamente). El volumen de tumor se muestra
15 como media de grupo $\pm$ EEM.

[0068] Las **Figuras 19A-19B** muestran el cambio en volumen de tumor con el tiempo en ratones implantados con células de tumor HBL-2. **Figura 19A:** ratones hembra NSG B2m-/- ($n = 8$ por grupo) se implantaron intradérmicamente (ID) con células de tumor HBL-2
20 (5×10^6) en el Día 0. ratones hembra NSG B2m-/- ($n = 8$ por grupo) se implantaron intradérmicamente (ID) con células de tumor HBL-2 (5×10^6) en el Día 0. En el Día 4, los ratones se implantaron con los PBMC (5×10^7) intraperitonealmente (IP). Entonces los ratones fueron tratados intravenosamente (IV) con vehículo, **DART**
25 **de control 1**, o el **DART-A** biespecífico de CD19 x CD3 como se indica

(véanse flechas Rx). El volumen de tumor se muestra como una media de grupo $\pm$ EEM. **Figura 19B:** ratones hembra NSG B2m^{-/-} (n = 8 por grupo) se implantaron intradérmicamente (ID) con células de tumor HBL-2 (5×10^6) en el Día 0. En el Día 4, los ratones se implantaron con los PBMC (5×10^7) intraperitonealmente (IP). Entonces los ratones fueron tratados intravenosamente (IV) con vehículo, **DART de control 1** o el **DART-A** biespecífico de CD19 x CD3 como se indica (véanse flechas Rx). El volumen de tumor se muestra como una media de grupo $\pm$ EEM.

10 **[0069]** Las **Figuras 20A-20B** muestran niveles de células B circulantes con el tiempo en macacos cinomolgos después de la administración IV de hasta 4 ciclos de dosis escaladas semanalmente del **DART-A** biespecífico de CD19 x CD3. Los macacos cinomolgos en el Grupo 1 (n = 4) se trataron con vehículo $\rightarrow$ 0.5
 15 $\rightarrow$ 5 $\rightarrow$ 50 $\rightarrow$ 50 μ g/kg de DART-A administrados IV en los Días 1, 8, 15, 22, y 29 (indicado por líneas verticales punteadas) (**Figura 20A**). Los macacos cinomolgos en el Grupo 2 (n = 4) se trataron con vehículo $\rightarrow$ 2 $\rightarrow$ 10 $\rightarrow$ 100 $\rightarrow$ 100 μ g/kg de **DART-A** administrados IV en los Días 1, 8, 15, 22, y 29 (indicado por líneas verticales
 20 punteadas) (**Figura 20B**). Se muestran los datos de cada macaco cinomolgo.

[0070] Las **Figuras 21A-21D** muestran niveles de células B circulantes con el tiempo en macacos cinomolgos después de la administración IV de hasta 3 ciclos de dosis fijas semanalmente
 25 o hasta 5 ciclos de dosis fijas de **DART-A** cada 3 Días. Los macacos

cinomolgos en los Grupos 3-5 (n = 2 por grupo) se trataron con **DART-A** biespecífico de CD19 x CD3. El Grupo 3 (**Figura 21A**) recibió 5 ng/kg de **DART-A**; el Grupo 4 (**Figura 21B**) recibió 50 ng/kg de **DART-A**; y el Grupo 5 (**Figura 21C**) recibió 500 ng/kg de **DART-A**. El **DART-A** se administró IV en los Días 1, 8, y 15 (indicado por líneas verticales punteadas). Los macacos cinomolgos en el Grupo 6 (n = 2) (**Figura 21D**) se trataron con 500 ng/kg de **DART-A** administrado IV en los Días 1, 4, 8, 11, y 15 (indicado por líneas verticales punteadas). Se muestran los datos de cada macaco cinomolgo.

[0071] La **Figura 22** muestra el análisis farmacocinético (PK) de **DART-A** en ratones transgénicos con FcRn de humano. mAb 1, mAb 2 y mAb 3 fueron anticuerpos de IgG1 humanizados irrelevantes empleados como un control para permitir la determinación de la vida media típica del anticuerpo en los animales transgénicos.

[0072] La **Figura 23** muestra las curvas de supervivencia en un modelo de leucemia con células Raji-luc diseminadas en ratones reconstituidos con PBMC de humano después del tratamiento con 500 µg/kg de **DART-A** (■), 500 µg/kg de **DART de control 1** (▲) o un vehículo de control (●).

[0073] La **Figura 24** muestra las curvas de supervivencia en un modelo de leucemia de células Raji-luc diseminadas en ratones reconstituidos con PBMC de humano después del tratamiento con 500 µg/kg (●), 100 µg/kg (■), 20 µg/kg (○), 4 µg/kg (▲), 0.8 µg/kg (▼) o 0.16 µg/kg (□) de **DART-A**, 500 mg/kg (Δ) de **DART de control**

1 o un vehículo de control (♦).

[0074] La **Figura 25** muestra las curvas de supervivencia en un modelo de linfoma de células Raji.luc en ratones reconstituidos con PBMC de humano después del tratamiento con 0.5 mg/kg de **DART-A** (▲), 0.1 mg/kg de **DART-A** (■) o un vehículo de control (●).

[0075] La **Figura 26** muestra las curvas de supervivencia en un modelo de linfoma de células Raji.luc en ratones reconstituidos con PBMC de humano después del tratamiento con 500 µg/kg (■), 100 µg/kg (▲), 20 µg/kg (▼), 4 µg/kg (♦), 0.8 µg/kg (□) o 0.16 µg/kg (Δ) de **DART-A**, 0.1 mg/kg de **DART de control 1** (○) o un vehículo de control (●).

[0076] La **Figura 27** muestra el perfil de tiempo de concentración en suero de **DART-A** en un macaco cinomolgo dosificado con 10 µg/kg de **DART-A**.

[0077] La **Figura 28** muestra el número de la media ± EEM de células/µL CD45+/CD20+ como se determina por citometría de flujo para un estudio por Día y Grupo. Las líneas verticales discontinuas en los Días 8, 15, 22 y 29 indican cada dosis (D) de **DART-A** durante una infusión IV de 2 horas para animales de los Grupos 2-5; mientras que los animales del Grupo 1 continuaron recibiendo un vehículo de control. El eje x indica que el estudio por Día se separó en 3 segmentos abarcando del Día -7 al -1, del Día 0 al 63 y del Día 64-121.

[0078] Las **Figuras 29A-29I** muestran un análisis FACS representativo de células B neoplásicas (CD20+/CD5+) (**Figuras**

29A-29C), células T (CD4+ o CD8+) (**Figuras 29D-29E**) y activación de células T (CD25 en células T de CD4+ (**Figuras 29F-29G**) o CD8+ (**Figuras 29H-29I**)) en los PBMC CLL (E:T = 1:23) seguido de sin tratamiento (**Figura 29A**), DART-A (**Figuras 29C, 29E, 29G y 29I**)
5 o tratamiento con DART de control 1 (**Figuras 29B, 29D, 29F y 29H**) durante 6 Días.

Descripción detallada de la Invención

[0079] La presente invención se dirige a diacuerpos
10 monovalentes biespecíficos que comprenden dos cadenas de polipéptidos y que poseen un sitio de unión específico para un epítipo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítipo de CD3 (es decir, un "Diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD13"). De mayor preferencia, tales diacuerpos monovalentes
15 biespecíficos de CD19 x CD3 se componen de tres cadenas de polipéptidos y poseen un sitio de unión específico para un epítipo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítipo de CD3 y adicionalmente comprenden un dominio Fc de inmunoglobulina (es decir, un "Diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3").
20 Los diacuerpos monovalentes biespecíficos y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención son capaces de una unión simultánea a CD19 y CD3. La invención se dirige a composiciones farmacéuticas que contienen tales diacuerpos monovalentes biespecíficos o tales diacuerpos Fc monovalentes
25 biespecíficos. La invención se dirige adicionalmente a métodos

para el uso de tales diacuerpos en el tratamiento de enfermedades, en particular neoplasias hematológicas.

A. Anticuerpos y otras moléculas de unión

5 **1. Anticuerpos**

[0080] Como se utiliza en la presente, el término "Anticuerpos" no sólo abarca anticuerpos monoclonales o policlonales intactos, sino también mutantes de los mismos, variantes que ocurren naturalmente, proteínas de fusión que
10 comprenden una porción de anticuerpo con un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, y anticuerpos quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la
15 especificidad requerida. A través de esta solicitud, la numeración de residuos de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de anticuerpos es de acuerdo con el índice de los Estados Unidos como en Kabat *et al.* (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication No. 91-3242.
20 Como se utiliza en la presente, un "fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo" es una porción de un anticuerpo que posee al menos un sitio de reconocimiento de antígeno. Como se utiliza en la presente, el término que abarca fragmentos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), y de una sola cadena (scFv).

25 [0081] El término "**anticuerpo monoclonal**" se refiere a una

población de anticuerpos homogéneos en donde el anticuerpo monoclonal está comprendido de aminoácidos (de origen natural y de origen no natural) que se encuentran implicados en la unión selectiva de un antígeno. Los anticuerpos monoclonales son

5 altamente específicos, se dirigen contra un solo sitio antigénico. El término "anticuerpo monoclonal" no sólo abarca anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), de una sola cadena (scFv), mutantes

10 de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida

15 y la capacidad para unirse a un antígeno. Esto no presente limitarse con respecto a la fuente de anticuerpo o la manera en la cual éste se fabrica (por ejemplo, por hibridoma, selección de fago, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). El término incluye todas las inmunoglobulinas así como los

20 fragmentos, etc., descritos en lo anterior bajo la definición de "anticuerpo". Los métodos para fabricar anticuerpos monoclonales se conocen en la técnica. Un método que puede emplearse es el método de Kohler, G. et al. (1975) "*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity*", Nature

25 256:495-497 o una modificación del mismo. Típicamente, los

anticuerpos monoclonales se desarrollan en ratones, ratas o conejos. Los anticuerpos se producen al inmunizar un animal con una cantidad inmunogénica de células, extractos celulares, o preparaciones de proteína que contienen el epítipo deseado. El

5 inmunógeno puede ser, pero no limitarse a, células primarias, líneas celulares cultivadas, células cancerosas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, o tejido. Las células utilizadas para inmunización pueden cultivarse durante un período de tiempo (por ejemplo, al menos 24 horas) antes de su uso como un inmunógeno.

10 Las células pueden utilizarse como inmunógenos por ellas mismas o en combinación con un adyuvante no desnaturalizante, tal como Ribi. En general, las células deberán mantenerse intactas y de preferencia viables cuando se utilizan como inmunógenos. Las células intactas pueden dejar antígenos para detectar mayor que

15 las células rotas por el animal inmunizado. El uso de desnaturalizantes o adyuvantes agresivos, por ejemplo, adyuvante de Freud, puede romper células y por lo tanto no se recomienda. El inmunógeno puede administrarse múltiples veces a intervalos periódicos tales como, cada dos semanas, o semanalmente, o puede

20 administrarse de tal manera que mantenga la viabilidad en el animal (por ejemplo, en un tejido recombinante). Alternativamente, los anticuerpos monoclonales existentes y cualesquier otros anticuerpos equivalentes que son inmuno-específicos para un epítipo patogénico deseado pueden

25 secuenciarse y producirse de forma recombinante por cualesquier

medios conocidos en la técnica. En una modalidad, tal anticuerpo se somete a secuenciación y la secuencia de polinucleótidos entonces se clona en un vector para expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse

5 en un vector en una célula huésped y la célula huésped entonces puede expandirse y congelarse para un uso futuro. La secuencia de polinucleótidos de tales anticuerpos puede utilizarse para manipulación genética para generar las moléculas biespecíficas de la invención, así como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo

10 humanizado, o un anticuerpo canonizado, para mejorar la afinidad u otras características del anticuerpo. El principio general en humanizar un anticuerpo implica retener la secuencia básica de la porción del anticuerpo que se une al antígeno, mientras se intercambia el resto del anticuerpo no humano con secuencias de

15 anticuerpo de humano. Existen cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y aminoácidos predichos de los dominios variables ligero y pesado de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado o anticuerpo canonizado, es decir, decidir qué región

20 de estructura de anticuerpo utilizar durante el proceso de humanización o canonización (3) las metodologías/técnicas de humanización o canonización actuales y (4) la expresión de transfección del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,816,567; 5,807,715;

25 5,866,692; y 6,331,415.

2. Anticuerpos biespecíficos, diacuerpos multiespecíficos y diacuerpos DART™

[0082] La condición de "diacuerpos" no monoespecíficos
 5 proporciona una ventaja significativa sobre los anticuerpos: la capacidad de co-ligarse y co-localizar células que expresan epítomos diferentes. Por lo tanto, los diacuerpos bivalentes tienen aplicaciones de amplio alcance que incluyen terapia e inmunodiagnóstico. La bivalencia permite una mayor flexibilidad
 10 en el diseño e ingeniería del diacuerpo en diversas aplicaciones, proporcionando una avidéz intensificada para antígenos multiméricos, el entrecruzamiento de diferentes antígenos, y direccionamiento dirigido a tipos celulares específicos que cuentan con la presencia de ambos antígenos objetivo. Debido a
 15 su valencia incrementada, bajas tasas de disociación y rápida eliminación de la circulación (para diacuerpos de tamaño pequeño, en o debajo de ~50 kDa), las moléculas de diacuerpo conocidas en la técnica también muestran un uso particular en el campo de formación de imágenes de tumores (Fitzgerald et al. (1997)
 20 *"Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris"*, Protein Eng. 10:1221). De importancia particular es la co-ligadura de diferentes células, por ejemplo, el entrecruzamiento de células T citotóxicas para células de tumor (Staerz et al. (1985) *"Hybrid Antibodies Can*
 25 *Target Sites For Attack By T Cells"*, Nature 314:628-631, and

Holliger et al. (1996) "*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*", Protein Eng. 9:299-305).

[0083] Los dominios de unión del epítopo del diacuerpo también
5 pueden dirigirse una superficie determinante de una célula B, tal
como CD19, CD20, CD22, CD30, CD37, CD40, y CD74 (Moore, P.A. et
al. (2011) "*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules
To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma*",
Blood 117(17):4542-4551; Cheson, B.D. et al. (2008) "*Monoclonal
10 Antibody Therapy For B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma*", N. Engl. J.
Med. 359(6):613-626; Castillo, J. et al. (2008) "*Newer monoclonal
antibodies for hematological malignancies*", Exp. Hematol.
36(7):755-768. En muchos estudios, el diacuerpo se une a de
células efectoras determinantes, por ejemplo, receptores Fcγ
15 (FcγR), también se encontró que activan las células efectoras
(Holliger et al. (1996) "*Specific Killing Of Lymphoma Cells By
Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*", Protein Eng.
9:299-305; Holliger et al. (1999) "*Carcinoembryonic Antigen
(CEA)-Specific T-Cell Activation In Colon Carcinoma Induced By
20 Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA
Bispecific Fusion Proteins*", Cancer Res. 59:2909-2916; WO
2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO
2012/162068). Normalmente, la activación de células efectoras se
desencadena por la unión de un anticuerpo de enlace al antígeno
25 a una célula efectora mediante la interacción Fc-FcγR; por lo

tanto, a este respecto, las moléculas de diacuerpo pueden mostrar funcionalidad similar a Ig independiente de si comprenden un Dominio Fc (por ejemplo, como se evaluó en cualquier ensayo de función efectora conocido en la técnica o ejemplificado en la presente (por ejemplo, ensayo de ADCC)). Por tumor entrecruzado y células efectoras, el diacuerpo no solo lleva a la célula efectora dentro de la proximidad de las células de tumor sino permite un exterminio efectivo del tumor (véase, por ejemplo, Cao et al. (2003) "*Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics*", Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197).

[0084] Sin embargo, las ventajas anteriores tienen un costo relevante. La formación de tales diacuerpos monoespecíficos requiere del ensamble exitoso de dos o más polipéptidos distintos y diferentes (es decir, tal formación requiere que los diacuerpos se formen a través de la heterodimerización de diferentes especies de cadenas de polipéptidos). Este hecho se encuentra en contraste con los diacuerpos monoespecíficos, los cuales se forman a través de la homodimerización de cadenas de polipéptidos idénticas. Debido a que al menos dos polipéptidos disimilares (es decir, dos especies de polipéptidos) deben proporcionarse para formar un diacuerpo no monoespecífico y debido a que la homodimerización de tales polipéptidos lleva a moléculas inactivas (Takemura, S. et al. (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*", Protein Eng. 13(8):583-588), la producción de tales

polipéptidos debe llevarse a cabo de una manera tal que evite la unión covalente entre los polipéptidos de la misma especie (es decir, para prevenir la homodimerización) (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588). La técnica por lo tanto ha enseñado la asociación no covalente de tales polipéptidos (véase, por ejemplo, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Resumen 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

20 **[0085]** Sin embargo, la técnica ha reconocido que los diacuerpos biespecíficos compuestos de polipéptidos no covalentemente asociados son inestables y fácilmente se disocian en monómeros no funcionales (véase, por ejemplo, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like

25

Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

[0086] Para enfrentar este reto, la técnica ha conseguido desarrollar diacuerpos no monoespecíficos heterodiméricos covalentemente enlazados estables, denominados **DART™** (véase, por ejemplo, Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nos. 2013-0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; Publicación de Patente Europea No. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones de PCT Nos. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; y Moore, P.A. et al. (2011) "*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Linfoma*", Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "*Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold*", Arthritis Rheum. 1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) "*Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion*", J. Mol. Biol. 399(3):436-449). Tales diacuerpos comprenden dos o más polipéptidos covalentemente acomplejados e implica diseñar por ingeniería uno o más residuos de cisteína en cada una de las especies de polipéptido empleadas. Por ejemplo, la adición de un residuo de cisteína al c-término de tales constructos se ha mostrado que permite enlazar disulfuro entre las cadenas de polipéptidos, estabilizando los heterodímeros

resultantes sin interferir con las características de unión de la molécula bivalente.

[0087] Cada uno de los dos polipéptidos de **DART™** más simple comprende tres Dominios (**Figura 1**). El primer polipéptido
5 comprende: (i) un Dominio que comprende una región de unión de un Dominio variable de cadena ligera de la primera inmunoglobulina (VL1), (ii) un segundo Dominio que comprende una región de unión de un Dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2), y (iii) un tercer Dominio que
10 sirve para promover la heterodimerización con el segundo polipéptido y para enlazar covalentemente el primer polipéptido al segundo polipéptido del diacuerpo. El segundo polipéptido contiene un primer Dominio complementario (un Dominio VL2), un segundo Dominio complementario (un Dominio VH1) y un tercer
15 Dominio que se acompleja con el tercer Dominio de la primera cadena de polipéptidos para promover la heterodimerización y unirse covalentemente con la primera cadena de polipéptidos. Tales moléculas son estables, potentes y tienen la capacidad de unir simultáneamente dos o más antígenos. Son capaces de promover
20 la exterminación mediada por células T redirigidas de células que expresan antígenos objetivo.

[0088] En una modalidad, los terceros Dominios del primer y segundo polipéptidos, cada uno contiene un residuo de cisteína, el cual sirve para unir los polipéptidos mediante un enlace de
25 disulfuro. El tercer Dominio de uno o ambos de los polipéptidos

puede poseer adicionalmente la secuencia de un Dominio de CH2-CH3, de tal manera que la forma acomplejada de los polipéptidos de diacuerpo forma un Dominio de Fc que es capaz de unirse al receptor de Fc de células (tal como linfocitos B, células dendríticas, células de exterminio natural, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos) (**Figuras 2A-2B**). Muchas variaciones de tales moléculas se han descrito (véase, *por ejemplo*, Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2013-0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; Publicación de Patente Europea No. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones de PCT No. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Estos DART que llevan Fc pueden comprender tres cadenas de polipéptidos. El primer polipéptido de tal diacuerpo contiene tres Dominios: (i) un Dominio que contiene VL1, (ii) un Dominio que contiene VH2 y (iii) un Dominio que promueve la heterodimerización y la unión covalente con la primera cadena de polipéptidos del diacuerpo y (iv) un Dominio que contiene una secuencia de CH2-CH3. El segundo polipéptido de tal DART™ contiene: (i) un Dominio que contiene VL2, (ii) un Dominio que contiene VH1 y (iii) un Dominio que promueve la heterodimerización y la unión covalente con la primera cadena de polipéptidos del diacuerpo. El tercer polipéptido de tal DART™ comprende una secuencia de CH2-CH3. De esta manera, la primera y segunda cadenas de polipéptidos de tal DART™ se acomplejan en conjunto para formar un sitio de unión de VL1/VH1 que es capaz

de unirse al epítopo, así como también un sitio de unión de VL2/VH2 que es capaz de unirse al segundo epítopo. El primer y segundo polipéptidos se unen entre sí a través de una unión de disulfuro que implica residuos de cisteína en sus terceros Dominios
5 respectivos. Notablemente, la primera y tercera cadenas de polipéptidos se acomplexan entre sí para formar un Dominio Fc que se estabiliza mediante una unión de disulfuro. Tales diacuerpos tienen una potencia mejorada. Tales **DART™** que llevan Fc pueden tener cualquiera de dos orientaciones (**Tabla 1**):

10

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

15

20

B. Diacuerpos Monovalentes Biespecíficos de CD19 x CD3
Preferidos de la Presente Invención

[0089] La presente invención se dirige particularmente a diacuerpos monovalentes biespecíficos CD19 x CD3 que son capaces
25 de unirse simultáneamente a CD19 y CD3, y a los usos de tales

moléculas en el tratamiento neoplasias hematológicas. Aunque los diacuerpos monovalentes biespecíficos CD19 x CD3 son completamente funcionales, análogos a las modalidades obtenidas en la expresión génica a través de la optimización de codones (véase, por ejemplo, Grosjean, H. et al. (1982) "*Preferential Codon Usage In Prokaryotic Genes: The Optimal Codon-Anticodon Interaction Energy And The Selective Codon Usage In Efficiently Expressed Genes*" Gene 18(3):199-209), es posible intensificar adicionalmente la estabilidad y/o función de diacuerpos monovalentes biespecíficos CD19 x CD3 al modificar o refinar sus secuencias.

[0090] Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 preferidos de la presente invención son diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos CD19 x CD3 que están compuestos de tres cadenas de polipéptidos que se asocian entre sí para formar un sitio de unión específico por un epítipo de CD3 (véase, **Figura 2A-2B**), para ser capaz de unirse simultáneamente a CD19 y a CD3. De esta forma, tales diacuerpos se unen a un "primer antígeno", el cual puede ser ya sea CD3 o CD19, y un "segundo antígeno", el cual es CD19 cuando el primer epítipo es CD3, y es CD3 cuando el primer epítipo es CD19.

[0091] De preferencia, como se muestra en la **Figura 2A**, la primera de las tres cadenas de polipéptidos contendrá, en la dirección N-terminal a C-terminal, un N-término, el Dominio de Unión de Antígeno de un Dominio Variable de Cadena Ligera (**VL**)

de un "primer" antígeno (ya sea CD3 o CD19), el Dominio de Unión de Antígeno de un Dominio Variable de Cadena Pesada (**VH**) de un segundo antígeno (CD19, si el primer antígeno fue CD3; CD3, si el primer antígeno fue CD19), un Dominio de Promoción de Heterodímero, y un C-término. Un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1**) separa el Dominio de Unión de Antígeno del Dominio Variable de Cadena Ligera del Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable de Cadena Pesada. De preferencia, el Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable de Cadena Pesada se enlaza con el Dominio de Promoción de Heterodímero por un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 2**). En el caso de diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3, el término del Dominio de Promoción de Heterodímero se enlaza con los dominios de CH2-CH3 de una región de Fc ("Dominio de Fc") por un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 3**) o por un péptido enlazador espaciador de intervención (**Espaciador-Enlazador 3**). De mayor preferencia, la primera de las tres cadenas de polipéptidos de esta forma contendrá, en la dirección de N-terminal a C-terminal: VL_{Primer Antígeno} - Enlazador 1 - VH_{Segundo Antígeno} - Enlazador 2 - Dominio que promueve el Heterodímero - Espaciador - Enlazador 3 - Dominio Fc.

[0092] Alternativamente, como se muestra en la **Figura 2B**, la primera de las tres cadenas de polipéptidos contendrá, en la dirección de N-terminal a C-terminal, un N-término, **Enlazador 3**, los dominios de CH2-CH3 de una región de Fc ("Dominio de Fc"),

un péptido espaciador de intervención (**Enlazador 4**), que tiene, por ejemplo la secuencia de aminoácidos: APSSS (**SEQ ID NO:47**) o la secuencia de aminoácidos APSSSPME (**SEQ ID NO:48**), el Dominio de Unión de Antígeno de un Dominio Variable de Cadena Ligera (**VL**) del primer antígeno (ya sea CD3 o CD19), el Dominio de Unión de Antígeno de un Dominio Variable de Cadena Pesada (**VH**) de un segundo antígeno (CD19, si el primer antígeno fue CD3; CD3, si el primer antígeno fue CD19), un Dominio de Promoción de Heterodímero, y un C-término. Un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1**) separa el Dominio de Unión de Antígeno del Dominio Variable de Cadena Ligera del Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable de Cadena Pesada. De preferencia, el Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable de Cadena Pesada se enlaza con el Dominio de Promoción de Heterodímero por un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 2**). De mayor preferencia, la primera de las tres cadenas de polipéptidos de esta forma contendrá, en la dirección de N-terminal a C-terminal:

Enlazador 3 - Dominio de Fc - **Enlazador 4** - VL_{Primer Antígeno} - Enlazador 1 - VH_{Segundo Antígeno} - Enlazador 2 - Heterodímero - Dominio de Promoción.

[0093] De preferencia, la segunda de las tres cadenas de polipéptidos contendrá, en la dirección N-terminal a C-terminal, un N-término, el Dominio de Unión de Antígeno de un Dominio Variable de Cadena Ligera (**VL**) del segundo antígeno, el Dominio de Unión al Antígeno de un Dominio Variable de Cadena Pesada (**VH**)

del primer antígeno un Domino de Promoción de Heterodímero, y un C-término. Un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1**) separa el Dominio de Unión de Antígeno del Dominio Variable de Cadena Ligera del Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable de Cadena Pesada. De preferencia, el Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable de Cadena Pesada se enlaza con el Domino de Promoción de Heterodímero por un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 2**). De mayor preferencia, la segunda de las tres cadenas de polipéptidos de esta forma contendrá en dirección de N-terminal a C-terminal: VL_{Segundo Antígeno} - Enlazador 1 - VH_{Primer Antígeno} - Enlazador 2 - Dominio que promueve el Heterodímero.

[0094] De preferencia, la tercera de las tres cadenas de polipéptidos contendrá el péptido enlazador (**Enlazador 3**) y los dominios de CH2-CH3 de una región de Fc ("Dominio Fc").

[0095] El Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable de Cadena Ligera de la primera cadena de polipéptido interactúa con el Dominio de Unión de Antígeno del Dominio Variable de Cadena Pesada de la segunda cadena de polipéptidos para formar un sitio de unión de antígeno funcional que es específico para el primer antígeno (es decir, ya sea CD19 o CD3). Así mismo, el Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable de Cadena Ligera de la primera cadena de polipéptidos interactúa con el Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable de Cadena Pesada de la primera cadena de polipéptidos para formar un segundo sitio de unión de

antígeno funcional que es específico para el segundo antígeno (es decir, ya sea CD3 o CD19 dependiendo de la identidad del primer antígeno). De esta forma, la selección del Dominio de Unión de Antígeno del Dominio Variable de Cadena Ligera y el Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable de Cadena Pesada de la primera y segunda cadenas de polipéptidos se coordinan, de tal manera que las dos cadenas de polipéptidos colectivamente comprenden un Dominio de Unión al Antígeno de Dominios Variables de Cadena ligera y Pesada capaces de unirse al CD19 y CD3.

10

1. Enlazadores Preferidos

[0001] De mayor preferencia, la longitud del **Enlazador 1**, que separa tales Dominios de VL y VH de una cadena de polipéptidos se selecciona para impedir sustancial o completamente que se unan los Dominios de VL y VH entre sí. De esta manera, los dominios de VL y VH de la primera cadena de polipéptidos son sustancial o completamente incapaces de unirse entre sí. Así mismo, los dominios de VL y VH de la segunda cadena de polipéptidos son sustancial o completamente incapaces de unirse entre sí. Un péptido espaciador de intervención preferido (Enlazador 1) tiene la secuencia (**SEQ ID NO:1**): GGGSGGGG.

[0096] El propósito del **Enlazador 2** es separar el Dominio de VH de una cadena de polipéptidos del Dominio de Promoción de Heterodímero de esa cadena de polipéptidos. Cualquiera de una variedad de enlazadores puede utilizarse para el propósito del

25

Enlazador 2. Una secuencia preferida para tal **Enlazador 2** tiene la secuencia de aminoácidos: ASTKG (**SEQ ID NO:2**), que se deriva del dominio CH1 de IgG, o GGCGGG (**SEQ ID NO:3**), que posee un residuo de cisteína que puede usarse para enlazar de forma covalente la primera y segunda cadenas entre sí mediante un enlace disulfuro. Puesto que el **Enlazador 2**, ASTKG (**SEQ ID NO:2**) no posee una cisteína, el uso del **Enlazador 2** se asocia de preferencia con el uso de un Dominio de Promoción de Heterodímero que contiene cisteína, tal como el E-hélice de la **SEQ ID NO:12** o el K-hélice de **SEQ ID NO:13** (véase en lo siguiente).

[0097] El propósito del **Enlazador 3** es separar el Dominio de Promoción de Heterodímero de una cadena de polipéptido del Dominio Fc de esa cadena de polipéptidos. Cualquiera de una variedad de enlazadores puede utilizarse para el propósito del **Enlazador 3**. Una secuencia preferida para tal **Enlazador 3** tiene la secuencia de aminoácidos: DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:4**). Una secuencia preferida para el **Espaciador-Enlazador 3** tiene la secuencia de aminoácidos: GGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:5**).

2. Dominios de Promoción de Heterodímeros Preferidos

[0098] La formación de heterodímeros de la primera y segunda cadenas de polipéptidos pueden accionarse por la inclusión de Dominios de Promoción de Heterodímeros. Tales dominios incluyen GVEPKSC (**SEQ ID NO:6**) o VEPKSC (**SEQ ID NO:7**) sobre una cadena de polipéptidos y GFNRGEC (**SEQ ID NO:8**) o FNRGEC (**SEQ ID NO:9**) sobre

la otra cadena de polipéptidos (US2007/0004909).

[0099] De mayor preferencia, sin embargo, los Dominios de Promoción de Heterodímeros de la presente invención se forman de uno, dos, tres o cuatro dominios de hélice repetida en tándem de
 5 carga opuesta que comprende una secuencia de al menos seis, al menos siete o al menos ocho residuos de aminoácidos cargados (Apostolovic, B. et al. (2008) "*pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil*", *Biomacromolecules* 9:3173-3180; Arndt, K.M. et al. (2001) "*Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody*
 10 *Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain*", *J. Molec. Biol.* 312:221-228; Arndt, K.M. et al. (2002) "*Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils*", *Structure* 10:1235-1248; Boucher, C. et al. (2010) "*Protein*
 15 *Detection By Western Blot Via Coiled-Coil Interactions*", *Analytical Biochemistry* 399:138-140; Cachia, P.J. et al. (2004) "*Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance*
 20 *Spectroscopy*", *J. Mol. Recognit.* 17:540-557; De Crescenzo, G.D. et al. (2003) "*Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding*", *Biochemistry* 42:1754-1763; Fernandez-Rodriguez, J. et al. (2012)
 25 "*Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target*

Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag", Protein Science
 21:511-519; Ghosh, T.S. et al. (2009) "End-To-End And
 End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of
 Interacting Helix Pairs In Protein Structures", Acta
 5 Crystallographica D65:1032-1041; Grigoryan, G. et al. (2008)
 "Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions", Curr.
 Opin. Struc. Biol. 18:477-483; Litowski, J.R. et al. (2002)
 "Designing Heterodimeric Two-Stranded α -Helical Coiled-Coils:
 The Effects Of Hydrophobicity And α -Helical Propensity On Protein
 10 Folding, Stability, And Specificity", J. Biol. Chem.
 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. et al. (2012) "The d'--d--d'
 Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'--a--a' Vertical
 Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif", J. Amer.
 Chem. Soc. 134(5):2626-2633; Straussman, R. et al. (2007)
 15 "Kinking the Coiled Coil - Negatively Charged Residues at the
 Coiled-coil Interface", J. Molec. Biol. 366:1232-1242; Tripet,
 B. et al. (2002) "Kinetic Analysis of the Interactions between
 Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and
 Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for
 20 Surface Plasmon Resonance", J. Molec. Biol. 323:345-362;
 Woolfson, D.N. (2005) "The Design Of Coiled-Coil Structures And
 Assemblies", Adv. Prot. Chem. 70:79-112; Zeng, Y. et al. (2008)
 "A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed
 Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered
 25 Tropism", J. Gene Med. 10:355-367).

[00100] Tales dominios de hélice repetidos pueden ser repeticiones exactas o pueden tener sustituciones. Por ejemplo, el Dominio de Promoción de Heterodímeros de la primera cadena de polipéptidos puede comprender una secuencia de ocho residuos de aminoácidos cargados de forma negativa y el Dominio de Promoción de Heterodímeros de la segunda cadena de polipéptidos puede comprender una secuencia de ocho residuos de aminoácidos cargados de forma positiva (o *viceversa*). Carece de importancia que la hélice se proporcione en la primera o segunda cadens de polipéptidos, siempre que se utilice una hélice de carga opuesta para la otra cadena de polipéptidos. Sin embargo, un diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 preferido de la presente invención tiene una primera cadena de polipéptidos que tiene una hélice cargada negativamente. El aminoácido positivamente cargado puede ser lisina, arginina, histidina, etc., y/o el aminoácido negativamente cargado puede ser ácido glutámico, ácido aspártico, etc. El aminoácido positivamente cargado de preferencia es lisina y/o el aminoácido negativamente cargado de preferencia es ácido glutámico. Es posible que sólo un Dominio de Promoción de Heterodímero simple se emplee (puesto que tal dominio inhibirá la homodimerización y promoverá por consiguiente la heterodimerización), sin embargo, se prefiere que ambas de la primera y segunda cadenas de polipéptidos de los diacuerpos de la presente invención contengan Dominios de Promoción de Heterodímero.

[00101] En una modalidad preferida, uno de los Dominios de Promoción de Heterodímeros comprenderá cuatro dominios helicoidales de "E-hélice" en tándem (**SEQ ID NO:10: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK**), cuyos residuos de glutamato

5 formarán una carga negativa en pH 7, mientras el otro de los Dominios de Promoción de Heterodímeros comprenderá cuatro dominios de "K-hélice" en tándem (**SEQ ID NO:11: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE**), cuyos residuos de lisina

10 formarán una carga positiva en pH 7. La presencia de tales dominios cargados promueve la asociación entre el primer y segundo polipéptidos, y de esta manera fomenta la heterodimerización. Se prefiere especialmente un Dominio de Promoción de Heterodímeros en el cual uno de los cuatro dominios helicoidales de "E-hélice" en tándem de la **SEQ ID NO:10** se ha

15 modificado para contener un residuo de cisteína: **EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK** (**SEQ ID NO:12**). Asimismo, se prefiere especialmente, un Dominio de Promoción de Heterodímeros en el cual uno de los cuatro dominios helicoidales de "K-hélice" en tándem de **SEQ ID NO:11** se ha modificado para contener un residuo

20 de cisteína: **KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE** (**SEQ ID NO:13**).

3. Enlace Covalente de las Cadenas de Polipéptidos

[00102] Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención se diseñan de modo que su primera y

25 segunda cadenas de polipéptidos se enlazan covalentemente entre

sí mediante uno o más residuos de cisteína colocados a lo largo de su longitud. Tales residuos de cisteína pueden introducirse en el enlazador de intervención que separa los dominios VL y VH de los polipéptidos. Alternativamente, el **Enlazador 2** puede
 5 contener un residuo de cisteína. Adicional o alternativamente, el **Enlazador 3** puede contener un residuo de cisteína, como en la **SEQ ID NO:4** o **SEQ ID NO:5**. De mayor preferencia, uno o más dominios de hélice del Dominio de Promoción de Heterodímeros se sustituirá para contener un residuo de cisteína como en la **SEQ ID NO:12** o
 10 **SEQ ID NO:13**.

[00103] En modalidades particulares, los diacuerpos monovalente biespecífico de CD19 x CD3 de la presente invención pueden tener adicionalmente un Dominio de Unión de Albúmina para extender la vida media *in vivo*.

15

4. Dominios Fc Preferidos

[00104] El Dominio de Fc de los diacuerpos de Fc monovalentes bi-específicos de CD19 x CD3 de la presente invención pueden ser ya sea una región Fc completa (por ejemplo, una región Fc de IgG
 20 completa) o solamente un fragmento de una región Fc completa. Aunque el Dominio Fc de los diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención puede poseer la capacidad para unirse a uno o más receptores Fc (*por ejemplo*, FcγR(s)), de mayor preferencia tal Región Fc podría provocar la unión reducida
 25 a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA

(CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (en relación con la unión exhibida por la región Fc de tipo silvestre) o eliminará sustancialmente la capacidad de tal Dominio Fc para unirse a los receptores. El Dominio Fc de los diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención puede incluir parte o la totalidad del Dominio de CH2 y/o parte o la totalidad del Dominio de CH3 de una Región Fc completa, o puede comprender una secuencia de CH2 variante y/o de CH3 variante (que puede incluir, por ejemplo, una o más inserciones y/o una o más supresiones con respecto a los Dominios de CH2 o CH3 de una Región Fc completa). El Dominio Fc de los diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención pueden comprender porciones de polipéptido sin Fc, o pueden comprender porciones de Regiones Fc no completas naturalmente o pueden comprender orientaciones que no son de origen natural de Dominios de CH2 y/o CH3 (tal como por ejemplo, dos dominios de CH2 o dos dominios de CH3, o en la dirección N-terminal a C-terminal, un Dominio de CH3 vinculado a un Dominio de CH2, etc.).

[00105] En una modalidad preferida, la primera y tercera cadenas de polipéptido de los diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención cada uno comprende dominios de CH2-CH3 que se acomplejan juntos para formar un Dominio Fc de inmunoglobulina. La secuencia de aminoácidos del dominio de CH2-CH3 de la IgG1 humana es (**SEQ ID NO:14**):

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
 5 ALHNHYTQKS LSLSPGK

De esta manera, los Dominios CH2 y/o CH3 de la primera y tercera cadenas de polipéptidos ambas pueden estar compuestas de la **SEQ ID NO:14**, o una variante de la misma.

[0002] En particular, se prefiere que los dominios de CH2-CH3
 10 de la primera y tercera cadenas de polipéptidos de los diacuerpos
 de Fc monvalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente
 invención para mostrar la unión disminuida (o sustancialmente
 ninguna) a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B),
 FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (en relación con la unión
 15 exhibida por la región Fc de tipo silvestre (**SEQ ID NO:14**)). Las
 variantes de Fc y las formas mutantes capaces de mediar tal unión
 alterada se conocen en la técnica e incluyen sustituciones de
 aminoácidos en las posiciones 234 y 235, una sustitución en la
 posición 265 o una sustitución en la posición 297 (véase, por
 20 ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,624,821,
 incorporada en la presente para referencia). En una modalidad
 preferida, el Dominio de CH2 y CH3 de la primera y tercera cadenas
 de polipéptido de los diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos
 de CD19 x CD3 de la presente invención incluye una sustitución
 25 en la posición 234 con alanina y 235 con alanina.

[00106] Los Dominios de CH2 y/o CH3 de la primera y tercera cadenas de polipéptidos no necesitan ser idénticas en secuencia, y ventajosamente se modifican para fomentar la complejidad entre las dos cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, una sustitución de
5 aminoácidos (de preferencia, una sustitución con un aminoácido que comprende un grupo lateral voluminoso que forma una 'protuberancia', *por ejemplo*, triptófano) puede introducirse en el Dominio de CH2 o CH3 de manera que la interferencia estérica evitará la interacción con un dominio similarmente mutado y
10 obligará al dominio mutado a formar un par con un dominio en el cual se ha diseñado una mutación complementaria o de adaptación, es decir, 'el orificio' (*por ejemplo*, una sustitución con glicina). Tales conjuntos de mutaciones pueden diseñarse en cualquier par de polipéptidos que comprenden la molécula del
15 diacuerpo de Fc monovalente biespecífico, y además, diseñados en cualquier porción de las cadenas de polipéptidos del par. Los métodos de ingeniería de proteína para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización son bien conocidos en la técnica, en particular con respecto al diseño de moléculas
20 similares a inmunoglobulina, y se abarcan en la presente (véase *por ejemplo*, Ridgway et al. (1996) "'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization", Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface
25 Of A Homodimer Using A Phage Display Library", J. Mol. Biol. 270:

26-35, y Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis", J. Immunol. Methods 296:95-101; cada uno de los cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad. De preferencia, la 'protuberancia' se diseña en los Dominios de CH2-CH3 de una primera cadena de polipéptidos y el 'orificio' se diseña en los Dominios de CH2-CH3 de la tercera cadena de polipéptidos. De esta manera, la "protuberancia" ayudará a evitar la homodimerización de la primera cadena de polipéptidos mediante sus Dominios de CH2 y/o CH3. Como la tercera cadena de polipéptidos de preferencia contiene la sustitución del "orificio", se heterodimerizará con la primera cadena de polipéptidos así como se homodimerizará con sí misma. Una protuberancia preferida se crea al modificar un Dominio de Fc de IgG natural para contener la modificación T366W. Un orificio preferido se crea al modificar un Dominio de Fc de IgG natural para contener las modificaciones T366S, L368A y Y407V. Para ayudar a purificar el tercer homodímero de cadena de polipéptidos del diacuerpo de Fc monovalente biespecífico final que comprende la primera, segunda y tercera cadenas de polipéptidos, el sitio de unión a la proteína A de los Dominios de CH2 y CH3 de la tercera cadena de polipéptidos se somete a mutación de preferencia por la sustitución de aminoácido en la posición 435 (H435R). De esta manera, el homodímero de la tercera cadena de polipéptidos no se unirá a la proteína A, mientras que el diacuerpo de Fc monovalente

biespecífico retendrá su capacidad de unirse a la proteína A mediante el sitio de unión a la proteína A en la primera cadena de polipéptidos.

[00107] Una secuencia preferida para los Dominios de CH2 y CH3 de la primera cadena de polipéptidos de los diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención tendrá la secuencia **"que lleva la protuberancia"** (SEQ ID NO:15):

```

APEAAGGPSV  FLFPPKPKDT  LMISRTPEVT  CVVVDVSHED  PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK  PREEQYNSTY  RVVSVLTVLH  QDWLNGKEYK  CKVSNKALPA
10  PIEKTISKAK  GQPREPQVYT  LPPSREEMTK  NQVSLWCLVK  GFYPSDIAVE
WESNGQPENN  YKTTTPVLDS  DGSFFLYSKL  TVDKSRWQQG  NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS  LSLSPGK

```

[00108] Una secuencia preferida para los Dominios de CH2 y CH3 de la tercera cadena de polipéptidos de los diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención tendrá la secuencia **"que lleva el orificio"** (SEQ ID NO:16):

```

APEAAGGPSV  FLFPPKPKDT  LMISRTPEVT  CVVVDVSHED  PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK  PREEQYNSTY  RVVSVLTVLH  QDWLNGKEYK  CKVSNKALPA
PIEKTISKAK  GQPREPQVYT  LPPSREEMTK  NQVSLSCAVK  GFYPSDIAVE
20  WESNGQPENN  YKTTTPVLDS  DGSFFLVSKL  TVDKSRWQQG  NVFSCSVMHE
ALHNRYTQKS  LSLSPGK

```

[00109] Como se observará, los Dominios de CH2-CH3 de **SEQ ID NO:15** y **SEQ ID NO:16** incluyen una sustitución en la posición 234 con alanina y 235 con alanina, y de esta manera forman un Dominio de Fc que muestra una unión disminuida (o sustancialmente

ninguna) a Fc $\square$ RIA (CD64), Fc $\square$ RIIA (CD32A), Fc $\square$ RIIB (CD32B), Fc $\square$ RIIIA (CD16a) o Fc $\square$ RIIIB (CD16b) (en relación con la unión mostrada por la Región Fc de tipo silvestre (**SEQ ID NO:14**)).

[00110] [00196] Se prefiere que la primera cadena de
 5 polipéptidos tenga una secuencia de CH2-CH3 "que lleva la protuberancia", tal como aquella de **SEQ ID NO:15**. Sin embargo, como se reconocerá, un Dominio de CH2-CH3 "que lleva orificio" (por ejemplo, **SEQ ID NO:16**) podría emplearse en la primera cadena de polipéptidos, en cuyo caso, un Dominio de CH2-CH3 "que lleva
 10 la protuberancia" (por ejemplo, **SEQ ID NO:15**) puede emplearse en la tercera cadena de polipéptidos.

5. Dominios Variables de CD19 Preferidos

[00111] El Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable
 15 de Cadena Ligera de cualquier anticuerpo anti-CD19 puede utilizarse de acuerdo con la presente invención. De preferencia, sin embargo, tal Dominio de VL_{CD19} tendrá la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:17**):

ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA
 20 SNRASGVPSR FSGSGSGTDH TLTISSEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG
 TKLEIK

en donde las secuencias subrayadas son respectivamente, CDR1, CDR2, y CDR3, de los mismos:

VL_{CD19} CDR1: RASQSVSYMH (**SEQ ID NO:18**)
 25 VL_{CD19} CDR2: DASNRAS (**SEQ ID NO:19**)

VL_{CD19} CDR3: FQGSVYPFT (SEQ ID NO:20)

[00112] Asimismo, el Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable de Cadena Pasada de cualquier anticuerpo anti-CD19 puede utilizarse de acuerdo con la presente invención. De preferencia, sin embargo, tal Dominio de VL_{CD19} tendrá la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:21):

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSL TSGMGVGWIR QPPGKALEWL
AHIWDDDKR YNPALKSRILT ISKDTSKNQV FLTMTNMDPV DTATYYCARM
ELWSYYFDYW GQGT TVTVSS

10 en donde las secuencias subrayadas son respectivamente, CDR1, CDR2, y CDR3, de los mismos:

VL_{CD19} CDR1: TSGMGVG (SEQ ID NO:22)

VL_{CD19} CDR2: HIWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO:23)

VL_{CD19} CDR3: MELWSYYFDY (SEQ ID NO:24)

15

6. Dominios Variables de CD3 Preferidos

[00113] El Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable de Cadena Ligera de cualquier anticuerpo anti-CD3 puede utilizarse de acuerdo con la presente invención. De preferencia, sin embargo, tal Dominio de VL_{CD3} tendrá la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:25):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

25 en donde las secuencias subrayadas son respectivamente, CDR1,

CDR2, y CDR3, de los mismos:

VL_{CD3} CDR1: RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:26)

VL_{CD3} CDR2: GTNKRAP (SEQ ID NO:27)

VL_{CD3} CDR3: ALWYSNLWV (SEQ ID NO:28)

5 [00114] Asimismo, el Dominio de Unión al Antígeno del Dominio Variable de Cadena Pasada de cualquier anticuerpo anti-CD3 puede utilizarse de acuerdo con la presente invención. De preferencia, sin embargo, tal Dominio de VL_{CD3} tendrá la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:29):

10 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT L VTVSS

en donde las secuencias subrayadas son respectivamente, CDR1, CDR2, y CDR3, de los mismos:

15 VL_{CD3} CDR1: TYAMN (SEQ ID NO:30)

VL_{CD3} CDR2: RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO:31)

VL_{CD3} CDR3: HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:32)

7. Dominio de Unión a Albúmina Opcional

20 [00115] Como se describe en la WO 2012/018687, para mejorar aún más las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y los diacuerpos de Fc de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención, tales diacuerpos pueden modificarse para
 25 contener una porción de polipéptidos de una proteína de unión al

suero en uno o más de los términos del diacuerpo. De mayor preferencia, tal porción de polipéptidos de una proteína de unión al suero se instalará en el C-término del diacuerpo. Una porción de polipéptidos particularmente preferida de una proteína de unión al suero para este propósito es el Dominio de Unión a Albúmina (ABD) de la proteína G de estreptococo. El Dominio de Unión a Albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de cepa G148 de Estreptococo es particularmente preferida.

[00116] El Dominio 3 de Unión a Albúmina (ABD3) de la proteína G de la cepa G148 de Estreptococo consiste de 46 residuos de aminoácidos que forman un mazo estable de tres hélices y tiene una amplia especificidad de unión a albúmina (Johansson, M.U. et al. (2002) "*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules*", J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). La albúmina es la proteína más abundante en plasma y tiene una vida media de 19 días en humanos. La albúmina posee diversos sitios de unión a moléculas pequeñas que le permiten unirse de forma covalente a otras proteínas y extender por consiguiente sus vidas medias en suero.

[00117] De esta manera, la segunda cadena de polipéptidos del diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 o diacuerpo de Fc monovalente biespecífico que tiene un Dominio de Unión de Albúmina que contiene un enlazador (**Enlazador 4**), el cual separa el E-hélice (o K-hélice) de tal cadena de polipéptidos del Dominio de Unión a Albúmina. Una secuencia preferida para tal **Enlazador**

4 es la **SEQ ID NO:33**: GGGS. Un Dominio de Unión a Albúmina (**ABD**) preferido tiene la secuencia (**SEQ ID NO:34**):
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP.

5 C. Diacuerpo de Fc Monovalente Biespecífico de CD19
x CD3 Ilustrativo, "DART-A"

[00118] La invención proporciona un diacuerpo de Fc monovalente
bienespecífico de CD19 x CD3 ilustrativo capaz de unirse simultánea
y específicamente a CD19 y a CD3. Este diacuerpo ilustrativo se
10 indica como **"DART-A."** Se encontró que los diacuerpos de la
presente invención muestran una actividad funcional mejorada en
relación con otros diacuerpos de CD19 x CD3.

[00119] Como se indica en lo anterior, los diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención comprenden tres cadenas de polipéptidos. La primera cadena de polipéptidos de **DART-A** comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, un N-término, un dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD19 (VL_{CD19}) (**SEQ ID NO:17**), un enlazador de péptido de intervención (**Enlazador 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:1**)), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:29**), enlazador de péptido de intervención (**Enlazador 2**, ASTKG (**SEQ ID NO:2**)), un Dominio de Promoción de Heterodímeros (E-hélice) (**EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK** (**SEQ ID NO:12**)), un enlazador de péptido de intervención (**Espaciador-Enlazador 3**:

GGGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:5**)), un polipéptido que contiene los Dominios de CH2 y CH3 “**que llevan la protuberancia**” (secuencia de Dominio Fc , **SEQ ID NO:15**) y un C-término.

[00120] De esta manera, la primera cadena de polipéptidos de
5 **DART-A** está compuesta de: **SEQ ID NO:17 – SEQ ID NO:1 – SEQ ID NO:29**
– SEQ ID NO:2 – SEQ ID NO:12 – SEQ ID NO:5 – SEQ ID NO:15.

[00121] La secuencia de aminoácidos del primer polipéptido de
DART-A es (**SEQ ID NO:35**):

ENVLTQSPATLSVTPGEKATITCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAS
10 GVPSRFSGSGSGTDHTLTISLSLEAEDAATYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIKGGGS
GGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRI
RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGN
SYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGG
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
15 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

[00122] Un polinucleótido preferido que codifica un
20 polipéptido es (**SEQ ID NO:36**):

gagaatgtgctcacacagtcacctgcaactctgagcgtactccaggggagaagg
ccaccatcacgtgtagagcctcccagagtgtgagctacatgcactggtatcagca
gaaacctggacaagctcccaggttgctgatctatgacgcgagcaaccgggctagt
ggcgttccatcccgggttttctggctcaggatctggcactgaccacacctcacca
25 tatccagccttgaagccgaagatgccgcaacctactactgctttcaggggagtg

gtatcccttcacattcgggtcaggggtacaaagctggagattaaggggtggaggatcc
 ggcgggcggaggcgaggtgcagctgggtggagctctgggggaggcttgggtccagcctg
 gaggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagcacatacgc
 tatgaattgggtccgccaggctccaggggaaggggctggagtggggttgggaaggatc
 5 aggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgtgaagggtagat
 tcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaataaacagcct
 gaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaat
 tcttacgtgtcttgggtttgcttattggggacaggggacactgggtgactgtgtctt
 ccgctccaccaagggcggaagtggccgcatgtgagaaagaggttgctgctttgga
 10 gaaggaggtcgctgcacttgaaaaggaggtcgagccctggagaaaggcggcggg
 gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcggggggacggt
 cagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaaccc
 tgaggtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc
 aactgggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggagg
 15 agcagtacaacagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccagga
 ctgggtgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgt
 acaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtgggtg
 cctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatggg
 20 cagccggagaaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcct
 tcttcctctacagcaagctcacctgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgt
 cttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
 ctctccctgtctccgggtaaa

[00123] La segunda cadena de polipéptidos de **DART-A** comprende,
 25 en dirección de N-terminal a C-terminal, un N-término, un dominio

de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VL_{CD3})
 (SEQ ID NO:25), un enlazador de péptido de intervención
 (Enlazador 1; GGGSGGGG (SEQ ID NO:1)), un dominio VH de un
 anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD19 (VH_{CD19}) (SEQ ID
 5 NO:21), enlazador de péptido de intervención (Enlazador 2, ASTKG
 (SEQ ID NO:2)), un Dominio de Promoción de Heterodímeros
 (K-hélice) (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:13) y un
 C-término.

[00124] De esta manera, el segundo polipéptido de **DART-A** está
 10 compuesto de: SEQ ID NO:25 – SEQ ID NO:1 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID
 NO:2 – SEQ ID NO:13.

[00125] La secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido de
DART-A es (SEQ ID NO:37):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK
 15 RAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG
 GGGSGGGGQVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVIRQPPGKAL
 EWLAIHWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSKNQVFLTMTNMDPVDTATYYCARMEL
 WSYYFDYWGGTQTVTVSSASTKGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

[00126] Un polinucleótido preferido que codifica un
 20 polipéptido es (SEQ ID NO:38):

caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcggaactgtga
 ccctgacatgcagatccagcacaggcgagtgaccacatctaactacgccaattg
 ggtgcagcagaagccaggacaggcaccaagggcctgatcgggggtacaaacaaa
 agggctccctggaccctgcacggtttttctggaagtctgctgggcggaaggccg
 25 ctctgactattaccggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctct

gtggtatagcaatctgtgggtgttcgggggtggcacaaaactgactgtgctggga
 ggggggtggatccggcggaggtggacaggtgacactgaggggaatctggtccagctc
 tgggtgaaaccactcagacgctcactctcacttgcaccttttagtgggttctcact
 gtccacatctggcatgggagtaggctggattcgacagccacctgggaaagccttg
 5 gagtggccttgcccacatctggtgggatgacgacaagcgggtataatcccgccactga
 agagcagactgaccatcagcaaggatacatccaagaaccaggtgtttctgaccat
 gaccaacatggaccctgtcgatacagccacctactattgtgctcgcgatggagttg
 tggtcctactacttcgactattggggacaaggcacaaccgtgactgtctcatccg
 cctccaccaagggcaaagtggccgcatgtaaggagaaagttgctgctttgaaaga
 10 gaaggtcgccgcacttaaggaaaaggtcgagccctgaaagag

[00127] La tercera cadena de polipéptidos de **DART-A** comprende,
 en la dirección de N-terminal a C-terminal, un N-término, un
 péptido (**Enlazador 3**; DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:4**)), un polipéptido
 que contiene los Dominios de CH2 y CH3 “**que llevan orificio**”
 15 (secuencia de Dominio Fc , **SEQ ID NO:16**) y un C-término.

[00128] De esta manera, el tercer polipéptido de **DART-A** está
 compuesto de: **SEQ ID NO:4 – SEQ ID NO:16**.

[00129] La secuencia de aminoácidos del tercer polipéptido de
DART-A es (**SEQ ID NO:39**):

20 DKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKS
 LSLSPGK

25 [00130] Un polinucleótido preferido que codifica un

polipéptido tiene la secuencia (**SEQ ID NO:40**):

gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcggggggaccgt
 cagtcttcctcttccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccgacccc
 tgaggtcacatgctgtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc
 5 aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggagg
 agcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccagga
 ctggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgt
 acaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgagttg
 10 cgcagtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggg
 cagccggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctcct
 tcttcctcgtcagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcaggggaacgt
 cttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccgctacacgcagaagagc
 ctctccctgtctccgggtaaa

15

D. DARTS de Control

[00131] Para demostrar de manera más significativa las propiedades de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención, se construyeron dos DARTS de Control. El primer DART de control ("**DART de Control 1**") es capaz de unirse a fluoresceína y CD3. El segundo DART de control ("**DART de Control 2**") es capaz de unirse a fluoresceína y CD19.

[00132] El anticuerpo de anti-fluoresceína utilizado para formar los **DART de Control 1 y 2** fue el anticuerpo 4-4-20 (Gruber, 25 M. et al. (1994) "*Efficient Tumor Cell Lysis Mediated By A*

Bispecific Single Chain Antibody Expressed In Escherichia coli", J. Immunol. 152(11):5368-5374; Bedzyk, W.D. et al. (1989) "Comparison Of Variable Region Primary Structures Within An Anti-Fluorescein Idiotypic Family", J. Biol. Chem. 264(3): 1565-1569) y se utilizaron en diacuerpos de control. Las secuencias de aminoácidos de los dominios ligero variable y pesado variable del anticuerpo de anti-fluoresceína 4-4-20 son como sigue:

Secuencia de Aminoácidos del Dominio de Cadena Ligera Variable del Anticuerpo Anti-Fluoresceína 4-4-20 (**SEQ ID NO:41**):

DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNGNTYLRW YLQKPGQSPK
 VLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
WTFGGGTKLE IK

Secuencia de Aminoácidos del Dominio de Cadena Pesada Variable del Anticuerpo Anti-Fluoresceína 4-4-20 (**SEQ ID NO:42**):

EVKLDDETGGG LVQPGRPMKL SCVASGFTFS DYWMNWVRQS PEKGLEWVAQ
IRNKPYNJET YYSDSVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNNLRV EDMGIYYCTG
SYYGMDYWGQ GTSVTVSS

1. DART Control 1 (Fluoresceína x CD3)

[00133] La primera cadena de polipéptidos de **DART de Control 1** comprende, en dirección de N-terminal a C-terminal, un N-término, un dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a fluoresceína (VL₄₋₄₋₂₀) (**SEQ ID NO:41**), un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:1**)),

un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:29**), péptido enlazador de intervención (**Enlazador 2**, GGCGGG (**SEQ ID NO:3**)), un Dominio de Promoción de Heterodímero (E-hélice) (**EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK** (**SEQ ID NO:10**)), un péptido enlazador de intervención (**Espaciador-Enlazador 3**; GGGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:5**)), un polipéptido que contiene los Dominios de CH2 y CH3 "que llevan la protuberancia" (secuencia de Dominio Fc , **SEQ ID NO:15**) y un C-término.

10 **[00134]** De esta manera, la primera cadena de polipéptido de **DART Control 1** está compuesta de: **SEQ ID NO:41 – SEQ ID NO:1 – SEQ ID NO:29 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:10 – SEQ ID NO:5 – SEQ ID NO:15.**

[00135] La secuencia de aminoácidos del primer polipéptido de **DART de Control 1** es (**SEQ ID NO:43**):

15 DVVMTQTPFSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIIYKVS
 NRFSGVSPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKGG
 GSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRI
 RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY
 VSWFAYWGQGTLLTVSSASTKGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGDKTH
 20 TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00136] La segunda cadena de polipéptidos de **DART de Control 1** comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, un N-término,

un dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:25**), un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:1**)), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a fluoresceína (VH_{Fluor}) (**SEQ ID NO:42**), péptido enlazador de intervención (**Enlazador 2**, GGCGGG (**SEQ ID NO:3**)), un Dominio de Promoción de Heterodímeros (K-hélice) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:11**) y un C-término.

[00137] De esta manera, la segunda cadena de polipéptido de **DART Control 1** está compuesta de: **SEQ ID NO:25 – SEQ ID NO:1 – SEQ ID NO:42 – SEQ ID NO:2 – SEQ ID NO:11.**

[00138] La secuencia de aminoácidos de la segunda cadena de polipéptido de **DART Control 1** es (**SEQ ID NO:44**):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAP
 WTPARFSGSLLGKKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGG
 GGEVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPY
 NYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWQGQTSV
 TVSSASTKGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

[00139] La tercera cadena de polipéptidos de **DART Control 1** comprende, en dirección de N-terminal a C-terminal, un N-término, un péptido (**Enlazador 3**; DDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:4**)), un polipéptido que contiene los Dominios de CH2 y CH3 “que llevan orificio” (secuencia de Dominio Fc, **SEQ ID NO:16**) y un C-término.

[00140] De esta manera, la segunda cadena de polipéptido de **DART Control 1** está compuesta de: **SEQ ID NO:4 – SEQ ID NO:16.**

[00141] La secuencia de aminoácidos de la tercera cadena de polipéptido de **DART Control 1** es (**SEQ ID NO:39**):

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 5 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSGDSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNRYTQKS
 LSLSPGK

2. DART de Control 2 (Fluoresceína x CD19)

[00142] La primera cadena de **DART Control 2** comprende, en la
 10 dirección de N-terminal a C-terminal, un N-término, un Dominio
 de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unir a CD19 (VL_{CD19})
 (**SEQ ID NO:17**), un enlazador de péptido de intervención
 (**Enlazador 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:1**)), un dominio VH de un
 anticuerpo monoclonal capaz de unirse a fluoresceína (VH_{Fluor}) (**SEQ**
 15 **ID NO:42**), enlazador de péptido de intervención (**Enlazador 2**,
 GGCGGG (**SEQ ID NO:3**), un Dominio de Promoción de Heterodímero
 (E-hélice) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:10**)), un
 enlazador de péptido de intervención (**Espaciador-Enlazador 3**;
 GGGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:5**)), un polipéptido que contiene los
 20 Dominios de CH2 y CH3 "que llevan protuberancia" (secuencia de
 Dominio de Fc , **SEQ ID NO:15**) y un C-término.

[00143] De esta manera, la primera cadena de polipéptido de **DART Control 2** está compuesta de: **SEQ ID NO:17 – SEQ ID NO:1 – SEQ ID NO:42 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:10 – SEQ ID NO:5 – SEQ ID NO:15.**

25 **[00144]** La secuencia de aminoácidos del primer polipéptido de

DART de Control 2 es (SEQ ID NO:45) :

ENVLTQSPATLSVTPGEKATITCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDASNRASGV
 PSRFSGSGSGTDHTLTISISLEAEDAATYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIKGGGSGGGG
 EVKLDDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYN
 5 YETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTV
 TVSSASTKGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGDKTHTCPPCPAPEAAGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYS
 10 KLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00145] La segunda cadena de polipéptidos de **DART Control 2** comprende, en la dirección de N-terminal a C-terminal, un N-término, un dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VL_{Flúor}) (**SEQ ID NO:41**), un enlazador de péptido de
 15 intervención (**Enlazador 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:1**)), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:29**), enlazador de péptido de intervención (**Enlazador 2**, GGCGGG (**SEQ ID NO:3**)), un Dominio de Promoción de Heterodímero (K-hélice) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:11**) y un
 20 C-término.

[00146] De esta manera, la segunda cadena de polipéptidos de **DART Control 2** está compuesta de: **SEQ ID NO:41 – SEQ ID NO:1 – SEQ ID NO:29 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:11.**

[00147] La secuencia de aminoácidos de la segunda cadena de
 25 polipéptidos de **DART Control 2** es (**SEQ ID NO:46**) :

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRA
 PWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYICALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGS
 GGGGEVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRN
 KPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ
 5 GTSVTVSSASTKGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

[00148] La tercera cadena de polipéptidos de **DART Control 2** comprende, en dirección de N-terminal a C-terminal, un N-término, un péptido (**Enlazador 3**; DDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:4**)), un polipéptido que contiene los Dominios de CH2 y CH3 "que llevan
 10 **orificio**" (secuencia de Dominio Fc, **SEQ ID NO:16**) y un C-término.

[00149] De esta manera, la segunda cadena de polipéptido de **DART Control 2** está compuesta de: **SEQ ID NO:4 – SEQ ID NO:16**.

[00150] La secuencia de aminoácidos de la tercera cadena de polipéptidos de **DART Control 2** es (**SEQ ID NO:39**):

15 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKS
 LSLSPGK

20

E. Composiciones Farmacéuticas

[00151] Tales composiciones incluyen composiciones de fármaco a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (*por ejemplo*, composiciones impuras o no estériles) y
 25 composiciones farmacéuticas (*es decir*, composiciones que son

adecuadas para administración a un sujeto o paciente) que pueden utilizarse en la preparación de formas de dosis unitaria. Tales composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de los diacuerpos monovalentes
5 biespecíficos de CD19 x CD3, o una combinación de tales agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. De preferencia, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de una o más moléculas de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 **[00152]** La invención también abarca composiciones farmacéuticas que comprenden un diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 de la invención (y particularmente, un diacuerpo de Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3), y un
segundo anticuerpo terapéutico (*por ejemplo*, una anticuerpo
15 monoclonal específico de tumor) que es específico para un antígeno de cáncer particular, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[00153] En una modalidad específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia
20 regulatoria del Gobierno Federal o Estatal o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (*por ejemplo*, adyuvante de Freund (completo e
25 incompleto), excipiente o vehículo con el cual se administra el

compuesto terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquido estériles, tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Si se desea, la composición también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes que regulan el pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

[00154] Generalmente, los ingredientes de las composiciones de la invención se suministran ya sea por separado o mezcladas en conjunto en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como un frasco ampolla o saquito que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición puede

administrarse por infusión, puede distribuirse con una botella de infusión que contiene un grado farmacéutico estéril de agua o solución salina. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse un frasco ampula de agua estéril para inyección o solución salina puede proporcionarse de modo que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

[00155] Las composiciones de la invención pueden formularse como formas neutras o sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a aquellas formadas con aniones tal como aquellas derivadas a partir de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes tales como aquellas derivadas a partir de hidróxido de sodio, potasio, amoníaco, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

[00156] La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con un diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 de la presente invención (y particularmente, un diacuerpo de Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3), solo o con tal portador farmacéuticamente aceptable. Además, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad también pueden incluirse en el paquete o kit farmacéutico. La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno

o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociados con tales recipientes pueden tener una advertencia establecida en forma por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, la advertencia refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para su administración humana.

[00157] La presente invención proporciona kits que pueden utilizarse en los métodos anteriores. Un equipo puede comprender diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3, y más preferiblemente, un diacuerpo de Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3, de la invención. El kit puede comprender además uno o más de otros agentes profilácticos y/o terapéuticos útiles para el tratamiento de cáncer, en uno o más recipientes; y/o el kit puede comprender además uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más antígenos de cáncer asociados con cáncer. En ciertas modalidades, el otro agente profiláctico o terapéutico es un quimioterapéutico. En otras modalidades, el agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico biológico u hormonal.

F. Métodos de Administración

[00158] Las composiciones de la presente invención pueden proporcionarse para el tratamiento, profilaxis, y mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o

infección al administrar a un sujeto una cantidad efectiva de una proteína de fusión o una molécula conjugada de la invención, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o una molécula conjugada de la invención. En un aspecto preferido, tales composiciones se purifican sustancialmente (*es decir*, se encuentran sustancialmente libres de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios indeseados). En una modalidad específica, el sujeto es un animal, de preferencia un mamífero tal como un no primate (*por ejemplo*, bovino, equino, felino, canino, roedor, *etc.*) o un primate (*por ejemplo*, un mono tal como, un macaco cinomolgo, humano, *etc.*). En una modalidad preferida, el sujeto es un humano.

[00159] Diversos sistemas de suministro se conocen y pueden utilizarse para administrar las composiciones de la invención, *por ejemplo*, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (*Véase, por ejemplo*, Wu *et al.* (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System", J. Biol. Chem. 262:4429-4432), la construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, *etc.*

[00160] Los métodos para administrar una molécula de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (*por ejemplo*, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural, y mucosa

(*por ejemplo*, intranasal y vías orales). En una modalidad específica, los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 o los diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la invención se administran intramuscular, intravenosa, 5 o subcutáneamente. Las composiciones pueden administrarse por cualquier ruta conveniente, *por ejemplo*, por infusión o inyección de bolos, por absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (*por ejemplo*, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, *etc.*) y pueden administrarse junto con otros 10 agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede emplearse la administración pulmonar, *por ejemplo*, por el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente en aerosol. Véanse, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,019,968; 15 5,985, 320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y Publicaciones de PCT Nos. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

20 **[00161]** La invención también proporciona que los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 (y particularmente los diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3) de la presente invención se empaquen en un recipiente herméticamente sellado tal como una frasco ampola o saquito que indican la 25 cantidad de la molécula. En una modalidad, los diacuerpos

monovalentes biespecíficos de CD19 X CD3 de la presente invención se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado y puede reconstituirse, *por ejemplo*, con agua o solución salina a la concentración apropiada para su administración a un sujeto. De preferencia, los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención se suministran como polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado en una dosis unitaria de al menos 5 µg, de mayor preferencia al menos 10 µg, al menos 15 µg, al menos 25 µg, al menos 50 µg, al menos 100 µg, o al menos 200 µg.

[00162] Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 liofilizados o diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención deben almacenarse entre 2 y 8°C en su recipiente original y las moléculas deben administrarse a las 12 horas, de preferencia a las 6 horas, a las 5 horas, a las 3 horas, o a la hora después de que se reconstituye. En una modalidad alternativa, los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión, o molécula conjugada. De preferencia, la forma líquida de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la invención se suministra en un recipiente herméticamente sellado en el cual las moléculas se encuentran

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

[00163] La cantidad de la composición de la invención la cual
5 será efectiva en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más
síntomas asociados con un trastorno puede determinarse por
técnicas clínicas estándar. La dosis precisa que va a emplearse
en la formulación también dependerá de la vía de administración,
y la seriedad del padecimiento, y deberá decidirse de acuerdo con
10 el juicio del profesional y cada una de las circunstancias del
paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de las
curvas de dosis-respuesta derivadas de los sistemas de prueba de
modelos en animales o in vitro.

[00164] Para diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x
15 CD3 o diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3,
abarcados por la invención, la dosificación administrada a un
paciente se determina de preferencia con base en el peso corporal
(kg) del sujeto receptor. La dosis administrada típicamente es
de al menos aproximadamente 0.3 ng/kg por día a aproximadamente
20 0.9 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 1 ng/kg por día
a aproximadamente 3 ng/kg por día, de al menos aproximadamente
3 ng/kg por día a aproximadamente 9 ng/kg por día, de al menos
aproximadamente 10 ng/kg por día a aproximadamente 30 ng/kg por
día, de al menos aproximadamente 30 ng/kg por día a
25 aproximadamente 90 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 100

ng/kg por día a aproximadamente 300 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 200 ng/kg por día a aproximadamente 600 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 300 ng/kg por día a aproximadamente 900 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 400 ng/kg por día a aproximadamente 800 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 500 ng/kg por día a aproximadamente 1000 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 600 ng/kg por día a aproximadamente 1000 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 700 ng/kg por día a aproximadamente 1000 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 800 ng/kg por día a aproximadamente 1000 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 900 ng/kg por día a aproximadamente 1000 ng/kg por día, o al menos aproximadamente 1,000 ng/kg por día.

[00165] En otra modalidad, se administra al paciente un régimen de tratamiento que comprende una o más dosis de tal cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 (y particularmente diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3) abarcados por de la invención, en donde el régimen de tratamiento se administra durante 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días. En ciertas modalidades, el régimen de tratamiento comprende administrar de forma intermitente dosis de la cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 abarcados por la presente invención (por ejemplo, administrar una dosis en el día

1, día 2, día 3 y día 4 de una semana determinada y no administrar dosis de la cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD19 (y particularmente, un diacuerpo de Fc monovalente biespecífico de
5 CD19 x CD3) abarcado por la invención en el día 5, día 6 y día 7 de la misma semana). Típicamente, existen 1, 2, 3, 4, 5 o más cursos de tratamiento. Cada curso puede ser el mismo régimen o un régimen diferente.

[00166] En otra modalidad, se logran las escalas de dosis administradas durante el primer trimestre, primer semestre o los
10 primeros dos semestres o tres trimestres de los regímenes (*por ejemplo*, durante el primer, segundo o tercer regímenes de un tratamiento de 4 cursos) hasta que la cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva diaria de los diacuerpos monovalentes
15 biespecíficos de CD19 x CD3 (y particularmente, un diacuerpo de Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3) abarcados por la invención.

[00167] La **Tabla 2** proporciona 5 ejemplos de diferentes regímenes de dosificación descritos en lo anterior para un curso
20 típico de tratamiento.

Tabla 2						
Régimen	DíaDía	Dosificación del Diacuerpo (ng de diacuerpo por kg de peso del sujeto por día)				
1	1, 2, 3, 4	100	100	100	100	100
	5, 6, 7	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
2	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
3	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
4	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna

[00168] La dosificación y frecuencia de administración de diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 o diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención pueden reducirse o alterarse al intensificar la captación y penetración en el tejido de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

[00169] La dosificación de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 o diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la invención administrada a un paciente puede calcularse para su uso como una terapia de un solo agente. Alternativamente los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 o diacuerpos de Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la invención se utilizan en

combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosis administrada a un paciente son menores que cuando las moléculas se utilizan como un solo agente de terapia.

[00170] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse localmente al área en necesidad de tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no a manera de limitación, por infusión local, por inyección, o por medio de un implante, el implante siendo de un material poroso, no poroso, o material gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. De preferencia, cuando se administra una molécula de la invención, debe tenerse cuidado de utilizar materiales en los que la molécula no se absorba.

[00171] Las composiciones de la invención pueden suministrarse en una vesícula, en particular un liposoma (Véase Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533); Treat et al., in LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327).

[00172] Las composiciones de la invención pueden suministrarse en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. Cualquier técnica conocida por alguien con experiencia en la técnica puede utilizarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más diacuerpos monovalentes bioespecíficos CD19 x CD3 de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,526,938;

Publicación de PCT WO 91/05548; Publicación de PCT WO 96/20698; Ning et al. (1996) "*Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A SustainedRelease Gel*", Radiotherapy & Oncology 39:179189, Song et al. (1995) "*Antibody Mediated Lung Targeting Of LongCirculating Emulsions*", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372397; Cleek et al. (1997) "*Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application*", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853854; y Lam et al. (1997) "*Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery*", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759760, cada una de las cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad. En una modalidad, una bomba puede utilizarse en un sistema de liberación controlada (Véase Langer, supra; Sefton, (1987) "*Implantable Pumps*", CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "*Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis*", Surgery 88:507-516; y Saudek et al. (1989) "*A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery*", N. Engl. J. Med. 321:574-579). En otra modalidad, los materiales poliméricos pueden utilizarse para lograr la liberación controlada de las moléculas (véase por ejemplo, MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); CONTROLLED DRUG

BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN Y PERFORMANCE, Smolen y Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "*Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate*", Science 228:190-192; During
 5 et al. (1989) "*Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization*", Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) "*Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits*", J. Neurosurg. 7(1):105-112); Patente de los Estados Unidos No. 5,679,377;
 10 Patente de los Estados Unidos No. 5,916,597; Patente de los Estados Unidos No. 5,912,015; Patente de los Estados Unidos No. 5,989,463; Patente de los Estados Unidos No. 5,128,326; Publicación de PCT No. WO 99/15154; y Publicación de PCT No. WO 99/20253). Ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de
 15 liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxi etilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etilen-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol
 20 vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(lactido-co-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. Un sistema de liberación controlada puede colocarse en proximidad del objetivo terapéutico (por ejemplo, los pulmones), requiriendo de esta manera solamente una fracción de la dosis
 25 sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, in MEDICAL APPLICATIONS OF

CONTROLLED RELEASE, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada pueden utilizarse de acuerdo con Dunn *et al.* (Véase U.S. 5,945,155). Este método particular se basa tras el efecto

5 terapéutico de la liberación controlada in situ del material bioactivo a partir del sistema polimérico. La implantación puede ocurrir generalmente en cualquier lado dentro del cuerpo del paciente en necesidad del tratamiento terapéutico. Pueden utilizarse un sistema de suministro sostenido no polimérico, por

10 lo cual un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto se utiliza como un sistema de suministro de fármaco. Tras la implantación en el cuerpo, el solvente orgánico del implante se disipará, dispersará, o lixiviará desde la composición hacia el fluido de tejido circundante, y el material no polimérico

15 coagulará gradualmente o se precipitará para formar una matriz microporosa sólida (Véase U.S. 5,888,533).

[00173] Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión por Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533). Cualquier técnica conocida por alguien

20 con experiencia en la técnica puede utilizarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, *por ejemplo*, Patente de los Estados Unidos Número 4,526,938; Las Publicaciones Internacionales Números WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning *et al.*

25 (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer

Xenograft Using A SustainedRelease Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of LongCirculating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372397; Cleek et al. (1997)

5 "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853854; y Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.

10 24:759760, cada una de las cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

[00174] En donde la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 de la invención, el ácido nucleico puede administrarse

15 *in vivo* para proporcionar expresión de su diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 codificado o diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3, al construirse como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrarse de modo que se vuelve intracelular, *por ejemplo*, por la utilización de

20 un vector retroviral (Véase la Patente de los Estados Unidos No. 4,980,286), o por inyección directa, o por el uso de bombardeo de micropartículas (*por ejemplo*, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o revestimiento con lípidos o receptores de superficie de célula, o agentes de transfección, o al administrarlo se

25 encuentra en un enlace con un péptido similar a homeosecuencia

que es conocido al ingresar los núcleos (See e.g., Joliot et al. (1991) "*Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868), etc. Alternativamente, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de célula huésped por la expresión por recombinación de homólogo.

[00175] El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva del diacuerpo bi-específico de CD19 x CD3 (y particularmente, un diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3) de la invención puede incluir un sólo tratamiento o, de preferencia, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto se trata con tal diacuerpo una vez por semana por entre aproximadamente 1 a 10 semanas, de preferencia entre 2 a 8 semanas, de mayor preferencia entre aproximadamente 3 a 7 semanas, e incluso de mayor preferencia durante aproximadamente 4, 5, o 6 semanas. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse una vez al día, dos veces al día, o tres veces al día. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez por año. También se apreciará que la dosificación efectiva de las moléculas utilizadas para la preparación puede incrementar o disminuir durante el curso de un tratamiento particular.

G. Usos de las Composiciones de la Invención

[00176] Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención (y particularmente, los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente invención) tienen la capacidad de tratar cualquier enfermedad o padecimiento asociado o caracterizado por la expresión de CD19. Por lo tanto, sin limitación, tales moléculas pueden emplearse en el diagnóstico o tratamiento de leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), incluyendo crisis blástica de CML y oncogén de Abelson asociado con CML (traslocación de Bcr-ABL), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia linfoblástica B aguda (B-ALL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica (CLL), incluyendo síndrome de Richter o transformación de Richter de CLL, leucemia de células pilosas (HCL), neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides (BPDCN), linfomas non-Hodgkin (NHL), incluyendo leucemia de células de manto (MCL), y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica, y linfoma de Burkitt ; Lupus Autoinmune (SLE), alergia, asma y artritis reumatoide. Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de la presente invención pueden utilizarse adicionalmente en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de los padecimientos descritos anteriormente.

Ejemplos

[00177] Habiendo ahora descrito generalmente la invención, la misma será más fácil de entender a mediante la referencia con los siguientes ejemplos, que se proporcionan a manera de ilustración y no se pretenden para ser limitantes de la presente invención a menos que se especifique.

Ejemplo 1

Cuantificación de Expresión de Superficie Celular de CD19

[00178] Para identificar las líneas celulares objetivo adecuadas para evaluar la actividad biológica de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3, primero se confirmaron los niveles de expresión de superficie celular utilizando FACS cuantitativos (QFACS) en un panel de líneas celulares de linfoma/leucemia de células B humanas, incluyendo Nalm-6 (leucemia linfoblástica aguda), Raji (linfoma de Burkitt), Daudi (linfoma de Burkitt), HBL-2 (linfoma de células de manto), MEC-1 (leucemia linfocítica crónica), y Jeko-1 (linfoma de células de manto), MOLM-13 (línea celular de leucemia mieloide aguda), JIMT1 (cáncer de mama) y Colo205 (cáncer de colon). Las cantidades absolutas de sitios de unión de anticuerpo de CD19 se calcularon utilizando un kit de QFACS. Como se muestra en la **Tabla 3**, las cantidades absolutas de los sitios de unión de CD19 en las líneas celulares fueron en el orden de Raji (alto) > Nalm-6 (medio) > Daudi (medio) > HBL2 (medio) > MEC-1 (bajo) > Jeko-1 (bajo). Como

se esperaba MOLM-3, JIMT-1 y Colo205 carecieron de expresión de CD19, que es consistente con CD19 que es un antígeno específico de células B.

5

10

Tabla 3	
Línea Celular Objetivo	Expresión de Superficie de CD19 (Sitios de Unión de Anticuerpo)
Raji	670,322
Nalm-6	442,730
Daudi	369,860
HBL-2	334,725
MEC-1	177,025
Jeko-1	124,396

Ejemplo 2

15

Afinidades de Unión

[00179] Para cuantificar la extensión de unión entre un diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 bi-specific y CD3 de humano o macaco cinomolgo, se realizaron análisis con BIACORE™ utilizando el diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3 ilustrativo, **DART-A**. Los análisis con BIACORE™ miden la constante de disociación, k_d . La afinidad de unión (KD) entre un anticuerpo y su objetivo es una función de las constantes cinéticas para asociación (constante de asociación, k_a) y disociación (constante de disociación, k_d) de acuerdo con la fórmula: $KD = [k_d]/[k_a]$. Los análisis con BIACORE™ utilizan

25

resonancia de plasmón superficial para medir directamente estos parámetros cinéticos.

[00180] Los resultados de unión de **DART-A** (0-100 nM) para CD3 y CD19 solubles de humano y macaco cinomolgo, analizados por tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) (BIAcore), se muestran en la **Tabla 4**.

[00181] La afinidad de unión de **DART-A** es similar para CD3 de humano y macaco cinomolgo ($K_D = 21.2 \text{ nM}$ y 21.9 nM , respectivamente). Sin embargo, **DART-A** tiene una afinidad baja aproximada de 10 veces para CD19 de macaco cinomolgo que para CD19 de humano ($K_D = 20.3 \text{ nM}$ y 2.0 nM , respectivamente) debido a una constante de disociación incrementada (k_d) de CD19 de macaco cinomolgo. El macaco cinomolgo permanece como una especie relevante para evaluaciones de toxicología, sin embargo debe considerarse la diferencia en afinidad de unión de CD19.

Tabla 4			
Antígenos	$k_a (\pm \text{SD})$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k_d (\pm \text{SD})$ (s^{-1})	$K_D (\pm \text{SD})$ (nM)
CD3 ϵ/δ Humano	2.2×10^5	$4.5 (\pm 0.1) \times 10^{-3}$	$21.2 (\pm 1.7)$
CD3 ϵ/δ Cinomolgo	$2.0 (\pm 0.1) \times 10^5$	$4.3 (\pm 0.2) \times 10^{-3}$	$21.9 (\pm 1.2)$
CD19-His Humano	$2.8 (\pm 0.3) \times 10^5$	$5.6 (\pm 0.6) \times 10^{-4}$	$2.0 (\pm 0.2)$
CD19-His Cinomolgo	$2.4 (\pm 0.1) \times 10^5$	$4.7 (\pm 1.1) \times 10^{-3}$	$20.3 (\pm 1.3)$

Ejemplo 3

Características de Unión Celular

[00182] La unión de **DART-A** a leucocitos en sangre de ratón,

rata, conejo, macaco cinomolgo y humano (purificados de la sangre total) se evaluó *in vitro* por citometría de flujo. Los leucocitos se tiñeron con **DART-A**, al igual que con **DART 1 Control** y **DART 2 Control**, a concentraciones de 25 ó 100 nM durante aproximadamente 1 hora. **El DART 2 Control** contiene el mismo componente de unión de CD19 como **DART-A**, mientras que **DART 1 de Control** contiene el mismo componente de unión de CD3 como **DART-A**. Después de la incubación, las proteínas de DART unidas a leucocitos se detectaron con un mAb de anti-E-hélice/K-hélice (EK), que reconoce la región de heterodimerización de la hélice de EK de las proteínas de DART. No se observó unión de **DART-A** en leucocitos en sangre de ratón, rata, o conejo. Del mismo modo, ni el diacuerpo de DART de Control mostró algún leucocito de ratón, rata o conejo. Como se esperaba, ambas concentraciones de **DART-A** probadas mostraron unión específica en los leucocitos en sangre de humano y macaco cinomolgo.

[00183] Se utilizó un ensayo ELISA bifuncional para demostrar el acoplamiento simultáneo de ambos antígenos objetivo por **DART-A**. Las placas de ELISA se recubrieron con heterodímero CD3 ϵ / δ humano soluble y se incubaron a 4C durante la noche y después se bloquearon con BSA. Se agregaron varias concentraciones de **DART-A** seguido de la adición de biotina de CD19 de humano soluble. Las placas se lavaron y el complejo inmune se detectó con sustrato quimioluminiscente conjugado con estreptavidina. Como se muestra en la **Figura 3**, **DART-A** es capaz

de unir a CD19 y CD3.

[00184] La unión bi-específica de **DART-A** se evaluó adicionalmente en leucocitos en sangre de humano y macaco cinomolgo (purificados de la sangre total) por citometría de fluido. Los leucocitos se tiñeron con **DART-A**, **DART 1 Control** o **DART 2 Control**, a concentraciones que oscilan de 0.005 a 80 nM durante aproximadamente 1 hora. Después de la incubación, la unión a los leucocitos se detectó utilizando un mAb de anti-E-hélice/K-hélice (EK) biotinilatado, que reconoce la región de heterodimerización de hélice de EK de las proteínas DART y PE de estreptavidina. Ya que **DART-A** une a CD3, se utilizó una combinación de CD4 y CD8 para definir la población de células T. De manera similar, se utilizó CD20 como un marcador de células B en lugar de CD19. Por lo tanto, los eventos de entrada de CD4+ y CD8+ representan la población de células T y los eventos de entrada de CD20+ representan la población de células B. **DART-A** demostró unión bi-específica en las células B y células T de humano y macaco cinomolgo. En contraste, los diacuerpos de DART de Control mostraron sólo unión mono-específica en las células B (**DART 2 Control**) o células T (**DART 1 de Control**) consistente con sus especificidades de unión correspondientes. Las curvas de valoración de unión de diacuerpos de DART de control y **DART-A** para células B y T de humano y macaco cinomolgo se proporcionan en las **Figuras 4A-4B** y **Figuras 5A-5B**.

Ejemplo 4

Aniquilación Redirigida Mediada por DART-A de Células de Tumor Objetivo Utilizando Células T Humanas.

[00185] La capacidad de **DART-A** para mediar la aniquilación de
5 células objetivo redirigida se evaluó en 3 líneas celulares B de
linfoma, Raji/GF (linfoma de Burkitt), HBL-2 (linfoma de célula
de manto), y Jeko-1 (linfoma de célula de manto), mostrando un
margen de expresión de CD19, utilizando células T primarias
humanas purificadas como células efectores. Las células de
10 Raji/GF cells mostraron los niveles más altos de expresión de
CD19, seguido por niveles medios de expresión de CD19 en células
HBL-2, y niveles bajos de expresión de CD19 en células Jeko-1.
La aniquilación de células de tumor objetivo se midió utilizando
un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en que
15 las células tras la muerte celular se miden cuantitativamente,
o por un ensayo de luciferasa en el que la unidad de luz en relación
a luciferasa (RLU) es la lectura para indicar la viabilidad
relativa de las células objetivo de Raji/GF, que se diseñan para
expresar la proteína fluorescente (GFP) y los genes indicadores
20 de luciferansa.

[00186] **DART-A** mostró aniquilación potente de células
redirigida en todas las 3 líneas celulares cuando las células T
se purificaron a partir de varios donadores humanos
independientes se utilizaron en un efector para el índice de
25 célula objetivo (E:T) de 10:1 (**Figuras 6A-6C**). La concentración

efectiva máxima en el 50% de valores de actividad máxima (EC50) fueron 1.05×10^{-1} pM para células de HBL-2; 3.07×10^{-1} pM para células de Raji/GF; y 1.46×10^{-1} pM para células de Jeko-1 (**Tabla 5**). El **DART 1 de Control** no medió la aniquilación redirigida de células T de células objetivo. De más importancia, no se observó actividad de aniquilación celular en líneas celulares (Molm-13 y Colo205) que no expresan CD19 (**Figuras 6D-6F**).

10

Tabla 5 Resumen de Valores de EC50 a partir de Aniquilación Redirigida Mediada por DART-A de Células Objetivo de Raji/GF en Índices E:T de Células Variantes						
	E:T = 10:1		E:T = 5:1		E:T = 2.5:1	
Citotoxicidad	EC50 (pM)	E _{max} (%)	EC50 (pM)	E _{max} (%)	EC50 (pM)	E _{max} (%)
24 horas	0.14	63	0.67	24	N/A	4
48 horas	0.0441	73	0.38	48	1.08	11

15

[00187] Para evaluar la actividad de **DART-A** en presencia de una cantidad baja de células efectores, la aniquilación celular redirigida se probó con ratios E:T bajos de célula de 5:1, 2.5:1, y 1:1 en células de Raji/GF después de la incubación con **DART-A** durante 24 a 96 horas. La actividad citotóxica observada en el índice de 5:1 fue aproximadamente la mitad de la actividad máxima observada en el índice de 10:1; bajo, también se observó la actividad específica con un índice E:T de célula de 2.5:1 en los puntos de tiempo de 24 y 48 horas (**Figuras 7A-7D y Tabla 5**). Después de la incubación durante 73 ó 96 horas, la citotoxicidad

20

25

de las células de Raji/GF incremento significativamente en los índices de 2.5:1 y 1:1 (véase **Figuras 8A-8D** y **Tabla 6**). Cabe resaltar que la lisis celular efectiva en los índices E:T más bajos de célula incremento en las células de Raji/GF con el tiempo, lo que sugiere una aniquilación serial de células objetivo por células T activadas por **DART-A**. Las cinéticas sugieren que el tiempo es el factor limitante para cantidades bajas de células T para eliminar eficientemente cantidades mayores de células objetivo. En conclusión, la información de varios experimentos utilizando células T humanas de diferentes donadores indica que la actividad de aniquilación de células redirigida por **DART-A** es dependiente de el índice E:T y el tiempo, particularmente en índices R:T más bajos de célula.

15

Tabla 6 Resumen de Valores de EC50 a partir de Aniquilación Redirigida Mediada por DART-A de Células Objetivo de Raji/GF en Índices E:T de Células Bajos				
	E:T = 2.5:1		E:T = 1:1	
Citotoxicidad	EC50 (pM)	E _{max} (%)	EC50 (pM)	E _{max} (%)
72 horas	1.54	64	2.79	33
96 horas	0.422	87	0.440	56

20

25

**Disminución de Células B Autólogas Mediada por DART-A en PBMCs
de Macaco Cinomolgo**

[00188] Ya que las células B normales expresan CD19 y ya que se mostró **DART-A** tiene reacción cruzada con CD19 y CD3 de macaco cinomolgo (**Exemplo 2, Figuras 4A-4B y Figuras 5A-5B**), la citotoxicidad mediada por **DART-A** se investigó en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de humano y macaco cinomolgo. Hubo una dosis dependiente de disminución de células B de CD20+ observada en PBMCs de humano y macaco cinomolgo después del tratamiento con **DART-A (Figuras 9A-9B)**. Como se esperaba, no se observó disminución de células B después del tratamiento con **xDART 1 de DART 1 Control**.

[00189] Para confirmar adicionalmente la actividad de **DART-A** en PBMCs, se utilizaron para evaluar la potencia, varios donadores de PBMC de humano o de macaco cinomolgo con índices E:T variantes de células T (efectores) para obtener células B (objetivo) En resumen (**Tabla 7**), los valores de EC50 para disminución de células B de humano osciló de 1.84 a 6.27 pM; mientras que los valores de EC50 para disminución de células B de macaco cinomolgo fueron entre 106.8 a 859.1 pM. La potencia de **DART-A** para de célula B autóloga de humano pareció mayor que aquella para la disminución de células B de macaco cinomolgo (aproximadamente 100 veces mayor por índice promedio: De 19 a 312 veces). Sin embargo, cabe resaltar que el índice E:T de célula en PBMCs de macaco cinomolgo (aproximadamente 4:1 en promedio)

fue menor que aquella en PBMCs de humano (aproximadamente 8:1 en promedio), lo que comúnmente contribuyó la diferencia mayor en valores de EC50 proporcionados de la que la actividad de aniquilación redirigida por **DART-A** es dependiente en el índice E:T de célula. Las posibles diferencias en niveles de expresión de CD19 entre células B de humano y macaco cinomolgo puede ser otro factor variable que contribuye a la diferencia aparente en potencia.

10

15

20

25

Tabla 7 Resumen de Valores de EC50 para Disminución de Células B Autólogas Después del Tratamiento de PBMCs de Humano y Macaco Cinomolgo con DART-A					
	Valores de EC50 (pM)			Valores de EC50 (pM)	
	DART-A	DART de Control		DART-A	DART de Control
Humano 5 (E:T= 8:1)	6.27	Sin actividad	Cino 5 (E:T= 3:1)	166.2	Sin actividad
Humano 6 (E:T= 8:1)	2.75	Sin actividad	Cino 6 (E:T= 2:1)	859.1	Sin actividad
Humano 7 (E:T= 5:1)	5.52	Sin actividad	Cino 7 (E:T= 3:1)	106.8	Sin actividad
Humano 8 (E:T= 9:1)	1.84	Sin actividad	Cino 8 (E:T= 7:1)	239.1	Sin actividad
Media	4.20	No aplicable	Media	342.8	No aplicable

[00190] Es importante resaltar que la citotoxicidad eficiente mediada con **DART-A** contra las células de objetivo de Raji/GF cuando se utilizaron PBMCs de macaco cinomolgo como células
 5 efectores con un EC50 de 1.30×10^{-2} pM (**Figura 10**) similar a aquella observada cuando se utilizaron células T de humano como células efectores (EC50 promedio = 3.07×10^{-1} pM), indicando que las células T de humano y macaco cinomolgo tienen actividad comparable contra la misma línea celular objetivo. Esta
 10 información además respalda la utilización del macaco cinomolgo como una especie relevante para la evaluación de **DART-A** en estudios toxicológicos no clínicos.

Ejemplo 6

15 **Evaluación de Liberación de Citocina Mediada con DART-A**

Utilizando Células Efectores de Humano o Macaco Cinomolgo

[00191] La disminución mediada por **DART-A** de la población de células B en PBMCs de humano y macaco cinomolgo se asocia con liberación de citocina en PBMCs de humano y macaco cinomolgo. Como
 20 se resume a continuación en la **Tabla 8**, los valores de EC50 para liberación de citocina son equivalentes o mayores que para la disminución de células B autólogas de humano o macaco cinomolgo, indicando que **DART-A** es más potente en mediar la disminución de células B que induce la liberación *in vitro* de citocina. Los
 25 perfiles de liberación de citocina entre humano y macacos

cinomolgo *in vitro* tienen algunas similitudes y diferencias. IFN- γ y TNF- α fueron las citocinas predominantes liberadas en ambas especies después del tratamiento con **DART-A**. Sin embargo, IL-6 la citocina más predominante producida en humanos basada en los valores de Emax, mientras que IL-2 se produjo en cantidades sustanciales sólo en PBMCs de macaco cinomolgo La comparación de los valores de EC50 de media para las citocinas más sensibles producidas en PBMCs (después de la incubación con **DART-A** (IFN- γ , TNF- α , y IL-6 en humanos) con los valores de EC50 de media para disminución de células B autólogas, reveló que existe al menos un margen de seguridad aparente de 6 veces como se refleja en la diferencia entre la disminución de células B y la producción de citocina en humanos (**Tabla 9**).

15

20

25

Tabla 8 Resumen de Valores de EC50 para Disminución de Células B Autólogas y Producción de Citocina Después del Tratamiento de PBMCs de Humano y Macaco Cinomolgo con DART-A	
PBMCs de Humano	
Ensayo (cantidad de donadores probados)	EC50 de media (pM)
Disminución de Células B de Humano (n = 4)	4.20
Disminución de Citocina B de Humano (n = 2)	
IFN- γ	25.21
TNF- α	31.83
IL-10	70.11
IL-6	23.55
IL-4	No aplicabe*
IL-2	56.77
PBMCs de Macaco Cinomolgo	
Disminución de Células B de Macaco Cinomolgo (n = 4)	342.8
Liberación de citocina de Macaco Cinomolgo (n = 2)	
IFN- γ	925.24
TNF- α	262.22
IL-6	306.68
IL-5	486.22
IL-4	1718.63
IL-2	2930.19
* límite inferior de detección	

Tabla 9 Resumen de Valores de EC50 para Citotoxicidad vs Producción de Citocina Después de Evaluación <i>in vitro</i> de DART-A en Células de Humano				
5	Ensayo ¹ de CTL		PBMCs ² de Humano	
	Ensayo (cantidad de donadores)	EC50 de media (pM)	Ensayo (cantidad de donadores)	EC50 de media (pM)
10	Citotoxicidad		Disminución de células B autólogas	
	HBL-2 (n = 5)	0.11	PBMCs (n = 7)	4.20
	Raji/GF (n = 5)	0.31		
	Jeko-1 (n = 3)	0.15		
15	Liberación de Citocina (n = 2)		Liberación de Citocina (n = 2)	
	IFN- γ	5.51	IFN- γ	25.21
	TNF- α	3.71	TNF- α	31.83
	IL-2	6.32	IL-6	23.55
20	diferencia de veces de EC50 (Margen Indicativo de Seguridad)	12-58	diferencia de veces de EC50 (Margen Indicativo de Seguridad)	6-8
	1 Se evaluó la actividad utilizando el ensayo de CTL con células de tumor que expresan CD19 (HBL-2, Raji/GF, o Jeko-1) en presencia de células T de humano purificadas (E:T = 10:1). Se evaluó la liberación de citocina utilizando células de tumor de Raji/GF. 2 Se evaluó la actividad en PBMCs de humano normales.			

[00192] También se investigó la liberación de citocina mediada por **DART-A** por células T en presencia de células objetivo. La

producción de citocina dependiente de la dosis de **DART-A** de TNF- α , IFN- γ , y IL-2 a partir de células de humano se observó con los niveles más altos (Emax) observados por IL-2 (> 7000 pg/mL) después de la co-incubación con células objetivo de Raji/GF (Figuras 11A-11C; Tabla 10). También se produjeron niveles sustanciales de TNF- α y IFN- γ (~2000-4000 pg/mL). Como se esperaba, la incubación con un diacuerpo de DART de Control no resultó en cualquier producción de citocina detectable (Figuras 11A-11C). Considerando el valor de media de EC50 para la citocina más sensible producida por células T de humano purificadas (TNF- α) después de la incubación con **DART-A** en presencia de células objetivo de expresión de CD19 (Raji/GF) comparadas con el valor medio de EC50 para citotoxicidad de célula objetivo en al menos una línea celular objetiva (Raji/GF), existe al menos un margen de seguridad aparente de 12 veces entre la aniquilación de células objetivo y la producción de citocina. (véase la **Table 9** anterior).

20

25

Tabla 10 Valores de EC50 para Producción de Citocina Mediada por DART-A por Células T en Presencia de Células Objetivo de Raji/GF a partir de Dos Donadores Independientes a E:T = 10:1				
	D47067		D44284	
Citocina	EC50 (pM)	Emax (pg/mL)	EC50 (pM)	Emax (pg/mL)
IFN- γ	8.58	3885	2.44	2219
TNF- α	6.79	3722	0.626	2361
IL-2	11.31	8496	1.33	7492

Ejemplo 7

Evaluación de Activación de Célula T de Humano y Macaco Cinomolgo Mediado por DART-A

[00193] El efecto en las células T durante la lisis de células
5 (Raji/GF cells) objetivo redirigidas mediada por DART-A **DART-A**
se caracterizó al evaluar la expresión de los marcadores CD69 y
CD25 de activación de la célula T. Los CD25 y CD69 aumentaron en
las células T CD4+ y CD8+ de humano y macaco cinomolgo en una
manera dependiente de dosis (**Figuras 12A-12D y Figuras 13A-13D**),
10 indicando que la aniquilación de células redirigidas mediada por
DART-A se asocia con una activación concomitante de células T.
No se observó activación de células T en presencia de células de
JIMT-1 de CD19 negativo (**Figuras 14A-14D**). Esta información
sugiere que la activación de las células T depende del
15 co-acoplamiento de las células objetivo. Para respaldar más esta
conclusión, el **DART 1 de Control** no medió la inducción de los
marcadores de activación de células T (**Figuras 12A-12D y Figuras**
13A-13D).

Ejemplo 8

20 Evaluación del Mecanismo de Acción de CD19 x CD3

[00194] Para confirmar que el mecanismo anticipado para la
aniquilación de células redirigidas mediada por CD19 x CD3 por
células Y es mediado por granzima B y perofina, los niveles
intracelulares de granzima B y perofina se midieron en las células
25 T después de la exposición a **DART-A** o **DART 1 de Control** en un ensayo

CTL. El aumento de los niveles de granzima B y perforina dependiente de la dosis en células de CD8+ y CD4+ se observó después de 24 horas de incubación de células de humano con **DART-A** en presencia de células objetivo de Raji/GF en un índice E:T de
5 célula de 10:1 (**Figuras 15A-15B**). En contraste, no se observó aumento de granzima B o perforina cuando las células T de humano se incubaron con células objetivo de Raji/GF y **DART 1 de Control**. Esta información respalda que la aniquilación de células objetivo mediado por **DART-A** puede mediar a través de trayecto de granzima
10 B y perforina. Cabe señalar, el aumento de granzima B (**Figura 15A**) y perforina (**Figura 15B**) fue más alto en células T de CD8+ en comparación con las células T de CD4+, consistente con la potencia de CTL más alta de células T de CD8+.

[00195] La expansión de células T durante el co-acoplamiento
15 de células efectoras: objetivo por CD9 x CD3 también se evaluó, proporcionando la proliferación concomitante con la activación de célula T reportada previamente. Las células T de humano etiquetadas con CFSE se cultivaron en conjunto con células objetivo de HBL-2 en un índice E:T de célula de 10:1 en presencia
20 de **DART-A** o **DART 1 de Control** en una concentración de 200 ng/mL. La proliferación de las células T etiquetadas con CFSE se monitoreó por niveles de dilución de CFSE en el transcurso del tiempo por análisis de FACS (**Figuras 16A-16B**). La **Figura 16A** muestra los perfiles de tinción de CFSE en presencia de **DART-A**
25 o DART1 de Control y células objetivo. La adición de **DART-A** llevó

a la proliferación (dilución de CFSE) con aproximadamente 75% de proliferación celular después de 72 horas de incubación (**Figura 16B**). En contraste, no se observó proliferación de las células T etiquetadas con CFSE en presencia de **DART 1 de Control**.

5

Ejemplo 9

Eficacia de Xenoinjertos Co-Mezclados

[00196] La inhibición de crecimiento de tumor de linfoma de célula B por **DART-A** se evaluó en ratones NOD/SCID hembra (n = 8/Grupo) inyectados con células de tumor de HBL-2 (linfoma de célula de manto humano) o Raji (linfoma de Burkitt) co-mezclados con células T de humano activadas. En ambos estudios, las células T de humano y las células de tumor (HBL-2 o Raji) se combinaron en un índice de 1:5 (1×10^6 y 5×10^6 células, respectivamente) y se inyectó SC en ratones en el Día 0. El control de vehículo (células de tumor solas), **DART-A**, o **DART 1 de Control** se administró IV subsecuentemente en los Días 0, 1, 2 y 3.

[00197] Como se muestra en la **Figura 17**, el crecimiento de las células de tumor de HBL-2 tumor se inhibió completamente después seguido del tratamiento IV con **DART-A** a niveles de dosis de ≥ 0.2 $\mu\text{g/kg}$. Aunque el tratamiento con $0.02 \mu\text{g/kg}$ **DART-A** pareció retrasar el crecimiento de los tumores de HBL-2, la respuesta no fue estadísticamente significativa. Los tumores de HBL-2 en los grupos de DART de control y de vehículo alcanzaron un volumen de tumor promedio de aproximadamente 1000 mm^3 en el Día 13.

25

[00198] Como se muestra en la **Figura 18**, no se observó crecimiento significativo de las células de tumor de Raji a través de la terminación del estudio (Día 28) en ratones tratados con **DART-A** en todas las dosis evaluadas (0.8 a 100 µg/kg). El
 5 tratamiento con 0.8 µg/kg de **DART-A** resultó en una respuesta completa en 7/8 ratones. Los tumores de Raji en los grupos de **DART 1 de Control** de vehículo demostraron crecimiento de tumor *in vivo* con volúmenes de tumor promedios que alcanzan $2449.4 \pm 421.1 \text{ mm}^3$ y $2968.2 \pm 200.0 \text{ mm}^3$, respectivamente, al final del estudio (Día
 10 28).

Ejemplo 10

Eficacia en Modelos de Tumor Establecidos

[00199] La actividad anti-tumor de **DART-A** se evaluó en un modelo de xenoinjerto de HBL-2 (infoma de célula de manto de humano) en
 15 ratones NSG B2m-/- hembra (n = 8/grupo). A los ratones se les implantó células de tumor de HBL-2 (5×10^6 células) de forma intradérmica (ID) en el Día 0 seguido por inyección intraperitoneal (IP) de PBMCs (5×10^7 células) en el Día 4. El tratamiento con vehículo, administrado IV de **DART 1 de Control**,
 20 o **DART-A** se inició en el Día 17 cuando los volúmenes promedio de tumor que reciben el vehículo, **DART 1 de Control**, o **DART-A** fueron 438.4 ± 80.2 , 433.7 ± 63.8 , y $531.7 \pm 122.5 \text{ mm}^3$, respectivamente. En el Día 21 (2ª administración de dosis), los volúmenes promedio de tumor habían incrementado hasta 1306.1 ± 240.4 , 1185.6 ± 138.7 ,
 25 y $958.5 \pm 216.1 \text{ mm}^3$ en los grupos tratados con vehículo, **DART 1**

de Control, y DART-A, respectivamente. En el Día 24 (3^{er} administración de dosis), el volumen promedio de tumor en el vehículo y los grupos de **DART 1 de Control** habían incrementado hasta 2401.3 ± 397.4 y 2623.7 ± 351.5 mm³, respectivamente. En
5 contraste, el grupo que recibió **DART-A** había disminuido en volumen en un 45% hasta 527.3 ± 148.3 mm³. Los tumores en el grupo de **DART-A** tratado continuó disminuyendo en tamaño, finalmente alcanzó un volumen final de 111.4 ± 38.9 mm³ en el Día 42, un 88.3% de disminución a partir del volumen máximo observado de tumor
10 (**Figura 19A**). En resumen, el tratamiento con 0.5 mg/kg de **DART-A** resultó en la reducción de los tumores de linfoma de célula grande de manto de HBL-2 establecidos. No se notó recaída hasta el Día 42 cuando el estudio finalizó.

[00200] Se programó otro grupo de ratones portadores de tumores
15 con un tamaño promedio de tumor de 541 mm³ (n = 4 ratones) en el Día 14 de Estudio para tratarse con 500 µg/kg **DART-A**. En el momento de la primera dosis (Día 17 de Estudio), los tumores alcanzaron un volumen promedio de 2279 ± 61 mm³ (**Figura 19B**). Sin embargo, antes de la tercera (Día 24 de Estudio) y cuarta (Día 28 de
20 Estudio) dosis, los volúmenes de tumor fueron 1469 ± 162 y 848 ± 74 mm³, respectivamente, representando un 36% y 63%, respectivamente, de disminución en el volumen de tumor con respecto al volumen máximo registrado en el Día 21 de Estudio
(**Figura 19B**). Los tumores continuaron disminuyendo en tamaño
25 hasta la extención en el día 42, el volumen promedio de tumor fue

248 ± 52 mm³, un 89% de disminución en el volumen de tumor (**Figura 19B**).

Ejemplo 11

Estado Toxicocinético de DART-A en Macacos Cinomolgos

5 **[00201]** Se realizó un estudio de toxicología de no-GLP (Buena
Práctica de Laboratorio) en macacos cinomolgos para evaluar las
dosis y regímenes diferentes de **DART-A**. 10° la Fase A se realizó
para evaluar infusiones IV de 2 horas de dosis intensificadas
intra-animal de **DART-A** cada semana sucesiva durante 4 semanas
10 como se resume en la **Tabla 11** (Fase A). En la mitad de la Fase
A los macacos cinomolgos en cada grupo (1M/1F) se sacrificaron
en el Día 36 o Día 64. La Fase B del estudio se realizó
subsecuentemente para evaluar las infusiones IV de 2 horas de
DART-A administradas como dosis fijas en cada grupo (**Tabla 11,**
15 Fase B). Para los Grupos 3, 4, y 5 se administró la misma dosis
(5, 50, o 500 ng/kg, respectivamente) cada semana sucesiva
durante un total de 3 dosis por animal. Para el Grupo 6, se
administró 500 ng/kg en los Días 1, 4, 8, 11, y 15 de Estudio como
una infusión IV de 2 horas para un total de 5 dosis por animal.
20 Todos los animales de Fase B se sacrificaron en el Día 18.

Tabla 11								
Diseño Experimental (Fase A)								
Grup o No.	Mac ho	Hembr a	Material de Prueba	Dosis	Día de Estudio de Dosifica ción	Nivel de Dosis (ng/kg)	Nivel de Volumen (mL/kg)	Concentración de Dosis (ng/mL)
1	2	2	Vehículo	1	1	0	0.3	0
			DART-A	2	8	500	0.3	1700
				3	15	5000	0.3	16,700
				4	22	50,000	0.3	166,700
				5	29	50,000	0.3	166,700
2	2	2	DART-A	1	1	0	0.3	0
				2	8	2000	0.3	7000
				3	15	10,000	0.3	33,300
				4	22	100,000	0.3	333,300
				5	29	100,000	0.3	333,300
3	1	1	DART-A	1	1	5	0.3	15.0
				2	8	5	0.3	15.0
				3	15	5	0.3	15.0
4	1	1	DART-A	1	1	50	0.3	150.0
				2	8	50	0.3	150.0
				3	15	50	0.3	150.0
5	1	1	DART-A	1	1	500	0.3	1500.0
				2	8	500	0.3	1500.0
				3	15	500	0.3	1500.0
6	1	1	DART-A	1	1	500	0.3	1500.0
				2	4	500	0.3	1500.0
				3	8	500	0.3	1500.0
				4	11	500	0.3	1500.0
				5	15	500	0.3	1500.0
* Se muestra en nivel de dosis real administrado basado en el análisis de las concentraciones de formulación de dosificación Se observa que las dosis reales fueron 10 veces menos de los niveles de dosis especificados de protocolo para la Fase B.								

1. Un Estudio Toxicocinético de DART-A en Macacos Cinomolgo (Fase A)

[00202] Se realizó un estudio no-GLP, exploratorio, intensificador de dosis de **DART-A** en macacos cinomolgos. En la Fase A del estudio, se administró a dos grupos de macacos

cinomolgos (n = 4/grupo; 2M/2F) con dosis intra-intensificadas de vehículo (Día 1) o **DART-A** como infusiones IV de 2 horas en los Días 1, 8, 15, 22, y 29. Los macacos cinomolgos en el Grupo 1 recibieron control de vehículo → 500 → 5000 → 50,000 → 50,000 ng/kg

5 **DART-A**. Los macacos cinomolgos en el Grupo 2 recibieron control de vehículo → 2000 → 10,000 → 100,000 → 100,000 ng/kg **DART-A**. En la mitad de la Fase A los macacos cinomolgos en cada grupo (1M/1F) se sacrificaron en el Día 36 o Día 64.

[00203] No hubo mortalidad relacionada con **DART-A** durante la

10 Fase A del estudio, y no hubo cambios de peso de órgano o macroscópicos relacionados con **DART-A**. Sin embargo, hubo efectos relacionados con **DART-A** en los niveles de dosis de ≥ 500 ng /kg como se detalla a continuación. Estos efectos fueron consistentes con la farmacología del artículo de prueba y no se consideraron

15 toxicológicamente significantes.

[00204] En la Fase A en el Día 36, los hallazgos microscópicos relacionados con **DART-A** se limitaron a los ganglios linfáticos (inguinal, mandibular, y mesentéricos), bazo y tejido linfoide asociado al intestino (GALT) para todos los animales del Grupo

20 1 y 2 sin recuperación de hallazgos microscópicos en el Día 64. En el Día 36, los hallazgos microscópicos en los nodos linfáticos y el bazo fueron similares y consistieron de una moderada a marcada disminución de centros germinales foliculares linfoides identificados; en el GALT hubo una disminución mínima en la

25 cantidad y tamaño de centros germinales foliculares linfoides.

En el Día 64, los hallazgos relacionados con el artículo de prueba, aún se presentaban en los nódulos linfáticos, el bazo, y GALT; en los nodos linfáticos y el bazo, los hallazgos microscópicos consistieron de moderada a marcada disminución de
5 cantidad y tamaño de centros germinales foliculares linfoides y en el GALT hubo una disminución mínima en la cantidad y tamaño de centros germinales foliculares linfoides.

[00205] La evaluación de la médula ósea (esternón), nódulos linfáticos (inguinal, mandibular, y mesentérico), y el bazo por
10 inmunohistoquímica (IHC) revelaron cantidades muy reducidas de células positivas de CD20 en los animales de Fase A en el Día 36 con sólo recuperación parcial de la tinción de CD20 en el Día 64. En el Día 36, no hubo, en general, tinción positiva en CD20 observada en la médula ósea o nódulos linfáticos de los animales
15 de Fase A con la excepción de un animal del Grupo 1 en el que muy raramente, de leve a moderado, la tinción positiva de CD20 se presentó en los centros germinales y la corona de linfocitos, respectivamente, sólo del nódulo linfático inguinal. En el bazo, las células positivas de CD20 se identificaron sólo en la pulpa
20 roja de 3 animales (1 animal del Grupo 1; 2 animales del Grupo 2) con la frecuencia de células positivas de CD20 que van raramente de raro y mínimo o medio a intensidad moderada.

[00206] En los animales en recuperación (Día 64), de muy raro a ocasional, las células positivas de CD20 moderadamente teñidas
25 se observaron en la médula ósea sólo de los animales de Grupo 1.

En los nódulos linfáticos (inguinal, mandibular y mesentérico), la tinción positiva de CD20 sólo se identificó en un animal del Grupo 1; la frecuencia de las células positivas de CD20 se redujo considerablemente por lo general en todos los nódulos linfáticos, mientras que la intensidad de tinción de las células positivas fue de moderada a notable. las células positivas de CD20 se identificaron en el bazo de todos los animales del Grupo 1 y 2. En los animales de Grupo 1, las células positivas de CD20 se identificaron en los folículos linfoides, vainas linfoides periarteriolas (PALS), y la pulpa roja en un animal y en las PALS y la pulpa roja en otro animal. En los animales del Grupo 2, se identificaron células positivas de CD20 de muy raro a raro en la pulpa roja sólo con intensidad media de tinción.

[00207] La evaluación de células B, disminución, citocinas y ADA basados en FACS en la porción de Fase A de este estudio se resume a continuación.

A. Evaluación de FACS para B, T, NK Células, y Monocitos

[00208] Se recolectaron muestras de sangre completas para evaluación citométrica de flujo de una variedad de subconjuntos de linfocito y poblaciones de célula de monocito. Los animales de la Fase A se evaluaron en la semana -1; antes de la dosificación en los Días 1, 8, 15, 22, y 29; 24 horas después de iniciar la infusión(SOI) en los Días 2, 9, 16, 23, y 30; 72 horas después de SOI en los Días 4, 11, 18, 25, y 32; Día 35; y en los Días 43,

50, 57, y 63 (sólo se aplicó a la mitad de los macacos cinomolgos de la Fase A de cada grupo con sacrificio de recuperación en el Día 64).

[00209] Las reducciones dependientes de dosis en los conteos absolutos de linfocitos B (CD20+) se presentaron en el principio del Día 9 (24 horas después de SOI) para ambos grupos (Grupos 1 y 2). Las poblaciones de linfocito B para los animales de 500 ng/kg/dosis (Grupo 1) tendieron hacia los niveles pre-estudio en los Días 11 y 15, mientras que los valores para los animales de 2000 ng/kg/dosis (Grupo 2) permanecieron reducidos. Los linfocitos B disminuyeron virtualmente en el Día 16 (24 horas después de SOI) siguiendo la segunda administración de dosis de **DART-A** para ambos grupos de dosis y permanecieron disminuidos durante todos los puntos de tiempo subsecuentes (**Figuras 20A-20B**). La disminución de linfocito B fue un efecto farmacológico anticipado de **DART-A**.

[00210] Otras poblaciones de células, incluyendo monocitos, células asesinas naturales (NK) y células T, también se evaluaron por citometría de flujo.

[00211] Las reducciones dependientes de dosis, transitorias en la cantidad de monocitos de CD14+ se presentaron en el principio del Día 9, 24 horas después de SOI, para la mayoría de animales dosificaciones en 2000 ng/kg (Grupo 2). Las reducciones en la cantidad monocitos de también se presentaron en el Día 16 y Día 23, 24 horas después de SOI, para la mayoría de los animales

dosificados a 5000 ng/kg y 50,000 ng/kg, respectivamente (Grupo 1) y para todos los animales dosificados a 10,000 ng/kg y 100,000 ng/kg, respectivamente (Grupo 2). Las poblaciones de monocito de CD14+ recuperadas rápidamente después del final de cada infusión y generalmente alcanzaron o excedieron valores de referencia antes del estudio por el siguiente punto de tiempo pre-dosis después de las dosis subsecuentes. Al final de la fase de dosificación, los monocitos de CD14+ fluctuaron con valores que tendieron hacia niveles antes de estudio y mantuvieron valores en o por encima de niveles de referencia antes del estudio.

[00212] También se observaron reducciones dependiente de dosis, transitorias para el total de linfocitos T, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos T reguladores (CD4+/CD25+/FoxP3+), células CD159a+ NK, células CD16+ NK, y células CD16+/CD159a+ NK, con las reducciones más grandes observadas para los animales de 2000 ng/kg/dosis (Grupo 2) en el Día 9 (24 horas después de SOI) y después de animales de 5000 ng/kg/dosis en Grupo 1 en el Día 16 (24 horas después de SOI). El linfocito T y el subconjunto de células NK se recuperaron rápidamente después del final de cada infusión y generalmente alcanzaron o excedieron valores de referencia antes del estudio antes de la siguiente dosis en los Días 15 y 22 antes de reducirse de nuevo 24 horas después de cada dosis. No se presentaron reducciones adicionales para el Grupo 1 ó 2 en el Día 30 (24 horas después de SOI) después de las dosis administradas en el Día 29.

[00213] También se evaluaron las poblaciones de linfocito T CD4+ y CD8+ para la supra-regulación de los marcadores de activación PD-1, TIM-3, CD25, y CD69 para determinar el estado de activación de las células después de la administración de dosis

5 de **DART-A**. Los incrementos de variable en las frecuencias de PD-1+, CD69+ y CD25+ en linfocitos T CD4+, y de PD-1+ y CD69+ en linfocitos T CD8+ se presentaron después de la dosificación, indicando un incremento en las frecuencias de los linfocitos T CD4+ y CD8+ activados en la sangre total después de la

10 dosificación. La frecuencia de CD69+, PD-1+, y CD25+ (hacia un grado más bajo, que ocurre en algunos pero no en todos los animales) en linfocitos T CD4+ y PD-1+ y CD69+ en linfocitos T CD8+ incrementó después del inicio de las dosis de 500 ng/kg (Grupo 1) y 2000 ng/kg (Grupo 2) en el Día 9 (24 horas después

15 de SOI). Estos valores generalmente permanecieron por encima de los niveles de referencia y fueron altamente variables para todos los puntos de tiempo subsecuentes. Los porcentajes relativos de las poblaciones de linfocitos de CD25+/CD69+, TIM-3+, y PD-1+/TIM3+ fueron generalmente < 1% del total de las poblaciones

20 de linfocitos T CD4+ y CD8+ T, haciendo cualquier cambio relacionado con **DART-A** difícil de evaluar. En conjunto, esta información sugiere que la administración de **DART-A** resultó en una tendencia ascendente en la expresión de PD-1 y CD69 en los linfocitos T CD4+ y CD8+ juntos con un incremento más modesto en

25 CD25+ en los los linfocitos T CD4+ en algunos, pero no en todos

los animales.

b. Evaluación de Citocina

[00214] Se determinaron los niveles de suero IL-2, IL-4, IL-5,
 5 IL-6, IL-10, TNF- α , y IFN- γ (ensayo EMD Millipore) pre-dosis y
 a 4 y 24 horas siguientes del inicio de cada infusión. Los
 incrementos correlacionados con dosis de **DART-A**, transitorios en
 los niveles IL-10 (hasta 1918 pg/mL) se observaron 4 horas después
 del inicio de infusión cuando se administro a los macacos
 10 cinomolgos dosis a escala que oscilaban de 500 a 50,000 ng/kg en
 el Grupo 1 y de 2000 a 100,000 ng/kg en el Grupo 2 por infusión
 IV durante un periodo de 2 horas para las primeras 3 dosis; los
 niveles generalmente regresaban al punto de referencia dentro de
 las 24 horas del inicio de infusión. Generalmente no se detectó
 15 IL-10 4 horas después del inicio de la última infusión de **DART-A**
 en cualquiera de los grupos (50,000 ng/kg en Grupo 1 o 100,000
 ng/kg en Grupo 2) con una excepción (Animal 2502). El animal 2502
 experimentó un incremento transitorio de IL-10 a 332 pg/mL
 siguiendo la última dosis (100,000 ng/kg en el Día 29), pero este
 20 incremento fue más bajo en magnitud que el incremento IL-10
 siguiendo la primera dosis 100 μ g/kg en el Día 22 (570 pg/mL).
 Un macaco cinomolgo (Animal 1001) en el nivel de dosis de 50,000
 ng/kg, experimentó los niveles de IL 10 mas altos (1918 pg/mL en
 el Día 22), también experimentó incrementos transitorios
 25 concurrentes en IL-2 (32 pg/mL), IL 5 (45 pg/mL), y IL-6 (357

pg/mL). Los incrementos transitorios en los niveles de IL-6 se observaron en la mayoría de macacos cinomolgos 4 horas después de la infusión de **DART-A**; sin embargo, los incrementos fueron generalmente similares a o de una magnitud baja (con excepción
5 del Animal 1001 descrito anteriormente) comparado con los niveles observados después de la infusión de control de vehículo en el Día 1 (hasta 190 pg/mL) sin respuesta de dosis clara. No hubo observaciones clínicas aparentes asociadas con niveles de citocina incrementados.

10 **[00215]** No hubo cambios consistentes en los niveles de IL-5, IL-4, IL-2, IFN- γ , o TNF- α después de la infusión de **DART-A**. Los niveles de IL-5 fueron variables con aproximadamente la mitad de los animales en cada grupo que experimentó incrementos pequeños y transitorios (~10-20 pg/mL; excepto el Animal 1001 descrito
15 anteriormente) después de la infusión de **DART-A** en los Días 15 o 22. Los niveles de IFN- γ también fueron variables a través del estudio con incrementos pequeños (< ~10 pg/mL) y transitorios después de la infusión en algunos animales.

20 **2. Un Estudio Toxicocinético de DART-A en Macacos Cinomolgos (Fase B)**

[00216] En la Fase B del estudio, se administró a 4 grupos de macacos cinomolgos (n = 2/grupo; 1M/1F) dosis fijas de **DART-A** como infusiones IV de 2 horas con 3 dosis administradas en los Días
25 1, 8 y 15 para el Grupo 3 (5 ng/kg), Grupo 4 (50 ng/kg), y Grupo

5 (500 ng/kg); y se administraron 5 dosis en los Días 1, 4, 8, 11, y 15 para el Grupo 6 (500 ng/kg). Todos los animales de la Fase B se sometieron a eutanasia en el Día 18.

[00217] No hubo mortalidad relacionada con **DART-A** durante la Fase B del estudio, y no hubo cambios de peso de órgano o macroscópicos relacionados con **DART-A**.

[00218] En el Día 18, los hallazgos microscópicos relacionados con **DART-A** se limitaron a los nódulos linfáticos (inguinal, mandibular, y mesentérico) y de bazo de animales de los Grupos 4, 5, y 6 y consistieron de un descenso mínimo a medio en la cantidad y tamaño de centros germinales foliculares linfoides se identificaron sin cambio aparente en el tamaño y/o densidad celular del tejido linfoide que comprende los PALS del bazo. No hubo hallazgos microscópicos reportados en el Grupo 3 (5 ng/kg).

15 [00219] Las secciones integradas en parafina, fijadas en formalina de médula ósea (esternón), nódulos linfáticos (inguinal, mandibular, y mesentético), y el bazo se evaluaron por IHC para las poblaciones de células que expresan CD20 (Mordenti, J. et al. (1991) "*Interspecies Scaling Of Clearance And Volume Of Distribution Data For Five Therapeutic Proteins*", Pharm. Res. 8(11):1351-1359). No se apreció diferencia en la intensidad de distribución y/o tinción de las células positivas de CD20 en le médula ósea (esternón), nódulos linfáticos (inguinal, mandibular, y mesentérico), o el bazo en los Grupos 3, 4, 5, ó 25 6. En todos los tejidos, la tinción positiva se asoció con la

membrana celular. En general, en la médula ósea se ubicaron células positivas de CD20 ocasionales a través del estroma de la médula ósea estroma y la intensidad de tinción de las células positivas fue de moderada a marcada. En the nódulos linfáticos, las células positivas de CD20 se asociaron principalmente con los centros germinales y la corona de linfocitos de folículos con pocas células positivas de CD20 ubicadas dentro de la paracorteza, los cordones medulares, y los senos medulares y subescapulares. La intensidad de tinción de los centros germinales, la corona de linfocitos, los cordones medulares, y los senos medulares y subescapulares fue de moderada a marcada. La intensidad de tinción en la paracorteza fue de media o moderada. En el bazo, las células positivas de CD20 fueron principalmente primarias asociadas con los centros germinales, el manto folicular, y la zona marginal de los folículos linfoides con pocas células positivas dentro de los PALS y y la pulpa roja y la tinción fue de intensidad moderada a marcada.

[00220] La evaluación de células B, disminución, citocinas y ADA basados en FACS en la porción de Fase B de este estudio se resume a continuación.

a. Evaluación de FACS para Células B, Células T, NK Células, y Monocitos

[00221] Se recolectaron muestras de sangre completas para evaluación citométrica de flujo de una variedad de subconjuntos

de linfocito y poblaciones de célula de monocito. Los animales de la Fase B se evaluaron en la Semana -1; antes de la dosificación en los Días 1, 4, (sólo Grupo 6) 8, 11 (sólo Grupo 6), y 15; 24 horas después de SOI en los Días 2, 9, y 16; y a las 72 horas después de SOI en los Días 4 y Día 11 (sólo Grupo 3-5).

[00222] Las reducciones dependientes de las dosis marcadas en la cantidad total de linfocitos B (CD20+) se presentaron 24 horas después del inicio de la infusión para dosis administradas en los Días 1, 8, y 15. Las reducciones más grandes para los grupos de tratamiento de 5 ng/kg (Grupo 3), 50 ng/kg (Grupo 4), y 500 ng/kg (Grupos 5 y 6) se presentaron en el Día 2 (24 horas después de SOI). Las poblaciones de linfocitos B se recuperaron rápidamente después de cada infusión en los 3 y 4 y se presentaron con valores fluctuantes cerca de los niveles de referencia antes del estudio en todos los puntos de tiempo. Los Grupos 5 y 6 se presentaron con recuperación mínima y se mantuvieron valores generalmente reducidos en todos los puntos de tiempo después del Día 2 (**Figuras 21A-21D**). La disminución sostenida de linfocito B fue un efecto farmacológico anticipado de **DART-A** a dosis altas.

[00223] Otras poblaciones de células, incluyendo monocitos, células NK y células T, también se evaluaron por citometría de flujo.

[00224] Las reducciones dependientes de dosis, transitorias se presentaron por un total de monocitos de CD14+ en el principio del Día 2, (24 horas después de SOI), para la mayoría de animales

en todos los grupos de dosificación (Grupos 3-6). También se presentaron cambios adicionales en los monocitos de CD14+ para la mayoría de los animales en todos los grupos de dosis en los Días 9 y 16 y los valores fueron altamente variables.

5 **[00225]** Las reducciones dependientes de la dosis, transitorias en la cantidad total de linfocitos T, linfocitos reguladores (CD4+/CD25+/FoxP3+), linfocitos T de CD4+, linfocitos T de CD8+ T, y subconjuntos de células NK se presentaron con las reducciones más grandes para todos los grupos (Grupo 3-6) generalmente
10 presentes en el Día 2 (24 horas después de SOI). Los subconjuntos de linfocito T se recuperaron rápidamente después de cada infusión y todas las dosis generalmente alcanzaron o excedieron los niveles antes del estudio antes de la siguiente infusión en todos los grupos. También se presentaron reducciones adicionales
15 para los linfocitos T de CD4+, CD8+, y reguladores en los Días 9 y 16 (24 horas después de SOI) para los animales dosificados con 50 ng/kg (Grupo 4), 500 ng/kg (Grupo 5), y multidosificados con 500 ng/kg (Grupo 6); sin embargo, las reducciones presentes en estos puntos de tiempo fueron de una magnitud baja en
20 comparación con aquellas presentes en el Día 2 después de la primer dosis con **DART-A**. Los subconjuntos de células NK generalmente tendieron a recuperarse después del primer día de infusión y se presentaron con valores variables a través de todos los puntos de tiempo restantes.

25 **[00226]** Se evaluaron las poblaciones de linfocito T CD4+ y CD8+

para la supra-regulación de los marcadores de activación PD-1, TIM-3, CD25, y CD69 para determinar el estado de activación de las células después de la administración de dosis de **DART-A**. Los porcentajes relativos de CD25+/CD69+ (sólo para linfocitos T CD4+), TIM-3+, y PD-1+/TIM3+ en las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ fueron generalmente < 1% del total de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, haciendo cualquier cambio relacionado con **DART-A** difícil de evaluar. Los incrementos en las frecuencias de PD-1+ y CD69+ en linfocitos T CD4 y CD8+ se presentaron a través de múltiples puntos de tiempo para los animales de 500 ng/kg/dosis en los Grupos 5 y 6 iniciando el Día 2 (24 horas después de SOI). Adicionalmente, se presentaron más incrementos modestos en la frecuencia de CD25+ en linfocitos T CD4+ y CD8+ para los animales de 500 ng/kg/dosis (Grupos 5 y 6) iniciando el Día 2 (24 horas después de SOI), al igual que incrementos en los porcentajes con relación a CD25+/CD69+ en los linfocitos T CD8+ para los animales de dosis múltiples de 500 ng/kg/dosis (Grupo 6). Los incrementos de una magnitud comparable con aquellas presentes en el Día 2 también se presentaron generalmente en los Días 9 y 16 (24 horas después de SOI) después de las dosis subsecuentes. En conjunto, esta información indica que la administración de **DART-A** resultó en una tendencia ascendente en PD-1, CD69, y la expresión de CD25 en los linfocitos T CD4+ y CD8+.

b. Evaluación de Citocina

[00227] Los niveles de suero IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , y IFN- γ niveles se determinaron (ensayo de Miliporo EMD) antes de la dosis en los Días -7, 8, y 15; y a 4 y 24 horas post-inicio de las infusiones en los Días 1, 8, y 15. El transitorio y el incremento correlacionado con la dosis en los niveles IL-10 (hasta 173 pg/mL) se observaron 4 horas siguiendo el inicio de la 1er infusión **DART-A** cuando a los monos cinomolgo se les administró dosis **DART-A** de 5, 50, o 500 ng/kg (Grupos 3-6); los niveles generalmente regresaron al punto de referencia dentro de 24 horas del inicio de la infusión. El incremento en IL-10 que parecía ser más pronunciado en todos grupos siguiendo la 1er dosis de **DART-A** comparada con el incremento de IL-10 siguiendo la 2^{da} y 3^{ra} dosis (< 22 pg/mL en todos animales con la excepción del Animal 5001 descrito en lo siguiente), sugiere ya sea "desensibilización" de liberación de citocina y/o reducción rápida/eliminación de la población de célula objeto responsable por la activación de la célula T siguiendo la 1st dosis. El transitorio incrementa en los niveles IL-6 (hasta 162 pg/mL) que se observaron variablemente en algunos animales a través de todos los grupos de dosis de 4 horas siguiendo el inicio de cada infusión **DART-A** con los niveles generalmente regresando a o cerca de los niveles de referencia dentro de 24 horas. Sin embargo, se observaron sobre la base de los datos generados a partir de la administración del vehículo en la Fase A en el cual incrementa

en niveles IL-6 hasta 190 pg/mL, los niveles de la fluctuación IL-6 en la Fase B ($\leq$ 162 pg/mL) no puede reflejar necesariamente respuestas relacionadas con el fármaco. No existen cambios consistentes observados en niveles de IL 5, IL-4, IL-2, IFN γ ,
 5 o TNF- α a través del estudio.

[00228] Un macaco cinomolgo (Animal 5001) experimentó niveles elevados de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL 5, y IL-10 en el Día 8 antes de la 2da infusión **DART-A**. Los niveles de citocina además incrementaron (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ , y TNF- α) o
 10 permaneció estable (IL-2) a 4 horas siguiendo la 2da infusión en el Día 8. Los niveles de citocina comenzaron a disminuir por 24 horas siguiendo la 2da dosis con incrementos variables en algunas citocinas siguiendo la 3ra infusión **DART-A** en el Día 15. Aunque todos los Niveles de citocinas disminuyeron de sus valores pico,
 15 los niveles de citocinas permanecieron elevados por encima de los niveles de referencia en el último punto de tiempo evaluado (Día 16) en este macaco cinomolgo. No hubo observaciones clínicas aparentes asociadas con el aumento de los niveles de citocinas.

20

Ejemplo 12

Media Vida similar a Ig en los Ratones Transgénicos de FcRn Humano

[00229] Un estudio farmacocinético de ratón transgénico de FcRn humano (PK) se realizó utilizando la cepa de ratón transgénico FcRn humano B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr} (CAG-FCGRT) 276Dcr/DcrJ ratón (Número
 25 de Stock 004919), disponible de Jackson Laboratories, Bar Harbor,

Maine, US, para evaluar **DART-A** y **Control DART 1** (**Figura 22**). La media vida terminal fue 85.6 y 92.1 horas, respectivamente. Tres mAbs humanos también se evaluaron en el mismo sistema de prueba mediante comparación y tuvieron medias vidas terminales que
 5 varían de 58.7 a 102.7 horas.

Ejemplo 13

Eficacia en Modelos de Leucemia/Linfoma Diseminada de Célula Raji en Ratones Reconstruidos PBMC Humanos

10 **[00230]** Los modelos de tumor diseminados se establecieron utilizando células de linfoma Raji transducidas por luciferasa (Raji.luc) en ratones NSG B2m-/- hembra reconstituídos con PBMCs humano en los cuales los ratones se trataron con el vehículo, **Control DART 1** o **DART-A** ya se aun día de la inyección de célula
 15 post-tumor (el "tratamiento temprano" o paradigma de leucemia) o después de al menos dos semanas de crecimiento in vivo (el modelo de "tumor establecido" o modelo de linfoma).

Modelo de Tratamiento Temprano

20 **[00231]** Después de la reconstitución PBMC humana sobre Estudio Día -14, las células de linfoma Raji.luc se inyectaron en el Estudio Día 0 y el tratamiento se inició al siguiente día (Día de Estudio 1). El control del vehículo control, 0.5 mg/kg **Control DART 1** o 0.5 mg/kg **DART-A** se inyectó IV una vez cada 3-4 días por
 25 un total de 12 dosis (es decir, Días de Estudio 1, 4, 6, 8, 11,

13, 15, 18, 20, 22, 25, y 27). Los ratones se siguieron por la supervivencia hasta el Día de Estudio 54 o Día de Estudio 56.

[00232] En los grupos que recibieron el vehículo o **control DART 1**, los perfiles de células tumorales diseminados difusos rápidamente se fusionaron y expandieron en la mayoría de los Ratones por las semanas 2 y 3. Se observaron las muertes del animal en estos dos grupos control lo más temprano como dos semanas de implantes de células post-tumor. todos los ratones en el vehículo o grupos **Control DART 1** murieron o se sacrificaron humanamente (es decir, si los animales se convirtieron en moribundos o perdieron más del 15% de su peso corporal) mediante el Estudio de los Días 40 ó 53, respectivamente. Las curvas de supervivencia se representaron en la **Figura 23**. En contraste, el grupo tratado con **DART-A** mostró crecimiento celular no tumoral en cualquier punto del tiempo y no se observaron en las muertes de los animales a lo largo del término del estudio. La curva de supervivencia se representa en la **Figura 23**.

[00233] Un estudio encontró una gama de dosis que se llevó a cabo en un siguiente experimento bajo las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente, excepto 0.16 µg/kg, 0.8 µg/kg, 4 µg/kg, 20 µg/kg, 0.1 mg/kg or 0.5 mg/kg **DART-A** se inyectaron IV una vez cada 3-4 días por un total de 12 dosis (es decir, Días de Estudio 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25, y 27). El vehículo y **Control DART 1** se administraron como se describe en los mismos Días de Estudio. Se observó una rápida

progresión del crecimiento tumoral Raji.luc en Ratones tratados con vehículo o **Control DART 1**. La eficacia demostrada de DART-A en todas las dosis probadas con la mayoría de los ratones que están vivos (>8%) y libres de tumor al final del estudio (Día 56) a dosis tan bajas como 20 µg/kg (**Figura 24**).

Modelo de Tumor Establecido

[00234] La capacidad de CD19 x CD3 para controlar la carga tumoral de células Raji.luc cuando se demora el tratamiento, se sometió a ensayó en un conjunto separado de experimentos. En el modelo de tumor establecido, los ratones reconstituidos de PBMC humano se inocularon con células Raji.luc IV del Día del Estudio 0 (aproximadamente una semana después de la inyección PBMC) y crecieron durante 14 Días antes del tratamiento de iniciación.

[00235] Los ratones se aleatorizaron en el Día de Estudio 12 en 3 grupos basados en la carga tumoral y posteriormente tratados con el vehículo, 0,1 mg/kg DART-A o 0,5 mg/kg DART-A partir del Día de Estudio 14 (2 semanas después de la inoculación de células Raji.luc) para un total de 10 dosis (es decir, Días de Estudio 14, 15, 16, 19, 21, 23, 30, 33, 35 y 37). En el grupo de control del vehículo, los focos iniciales aumentaron notablemente en el tamaño por el final de la primera semana de tratamiento y 5/7 Ratones murieron Dentro de 2 semanas del inicio del tratamiento (**Figura 25**). En contraste, la carga del tumor en la mayoría de los animales en ambos grupos de tratamiento DART-A se redujo o se despejó dramáticamente durante la primera semana de

tratamiento. Sólo un animal en cada grupo de tratamiento DART-A, cada uno con una carga relativamente alta de tumor presente en la aleatorización, murió durante la primera semana de tratamiento (**Figura 25**). Mediante el Día del Estudio 50, solamente 2 ratones en el grupo de tratamiento de 0.1 mg/kg **DART-A** tuvieron tumores periféricos tumorales restantes.

[00236] Un estudio encontró un margen de dosis en el modelo de tratamiento demorado se condujo bajo las condiciones experimentales generales descritas en lo anterior. En este experimento, los ratones reconstituidos de PBMC humano se inocularon con células IV Raji.luc sobre el Estudio del Día 0 (5 días después de la inyección CMSP) y se dejaron crecer en el Día del Estudio 14 antes de la aleatorización. Se inició el tratamiento en el Día del Estudio 15 con el vehículo, 0.1 mg/kg **Control DART 1** o 0.16 µg/kg, 0.8 µg/kg, 4 µg/kg, 20 µg/kg, 0.1 mg/kg o 0.5 mg/kg **DART-A** por un total de 9 dosis (es decir, Días de Estudio 15, 17, 21, 23, 25, 28, 30, 32 y 35).

[00237] En el grupo control del vehículo, la carga tumoral incrementó progresivamente y todos los ratones murieron o se sacrificaron al final de la segunda semana de tratamiento (**Figura 26**). Los ratones se trataron con 0.1 mg/kg **de Control DART 1** mostraron una ligera demora de un progreso de tumor comparado con los ratones tratados de vehículo (**Figura 26**). En el contrato, la carga tumoral en los animales tratados con DART-A mostró una reducción generalmente dependiente de dosis en el tiempo (**Figura**

26) .

Ejemplo 14

Farmacocinéticos de DART-A en monos cinomolgo

[00238] El macaco cinomolgo se seleccionó como un modelo
5 farmacológico apropiado para un análisis DART basado en la
distribución equivalente de ambos antígenos objetivo en esta
especie en comparación con los seres humanos basado en
inmunohistoquímica con los precursores mAbs.

[00239] El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la presente
10 invención incluyendo 5 grupos de tratamiento, que consistían de
10 monos cinomolgos por grupo (5 machos y 5 hembras). Los grupos
se trataron mediante infusión IV durante 2 horas con control de
vehículo para la primera infusión en el día 1, seguido de
tratamiento con vehículo de control (Grupo 1) o DART-A (Grupos
15 2-5) una vez por semana durante cuatro semanas. Mientras los
animales del Grupo 1 continuaron recibiendo el control del
vehículo para las 4 infusiones posteriores, los animales de los
grupos 2-5 recibieron DART-A en 0.2 µg/kg, 2 µg/kg, 5 µg/kg o 10
µg/kg todas las infusiones subsiguientes en los Días 8, 15, 22
20 y 29 (**Tabla 12**). Tres machos y 3 hembras se sacrificaron y la
necropsia en el día 37, mientras que los monos del grupo de
recuperación restantes (2 machos y 2 hembras) se sacrificaron y
la necropsia el día 121 después del período de recuperación de
12 semanas.

5

Tabla 12							
Infusión de Estudio No.	Infusión DART-A No. (Grupos solamente)	Día de Estudio	DART-A (µg/kg) Administrada como una infusión IV de 2-horas				
			Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
1	NA	1	0	0	0	0	0
2	1	8	0	0.2	2	5	10
3	2	15	0	0.2	2	5	10
4	3	22	0	0.2	2	5	10
5	4	29	0	0.2	2	5	10

10 [00240] El análisis de concentración de **DART-A** en suero recolectado en diversos puntos temporales se realizó con ELISA. El perfil de tiempo de concentración de suero DART-A para un animal representativo del Grupo 5 se muestra en la **Figura 27**. Se estimaron los parámetros PK (del modelo de dos compartimentos)

15 siguiendo la dosis de 0.2, 2, 5 y 10 µg/kg (**Tabla 13**). En general, el incremento proporcional de dosis en concentraciones de suero máximo (C_{max}) y AUC_{inf} se observaron a través del margen de dosis evaluado. Aunque las diferencias existieron durante varias comparaciones de dosis pares de parámetros PK primarios, en

20 general, no hubo tendencias consistentes en cambios en el aclaramiento (CL), aclaramiento intercompartimental (CLD_2) y volúmenes de distribución (V_1 y V_2) para **DART-A** través de las dosis evaluables sugiriendo PK lineal. Los valores de CL a través de

25 glomerular (TFG) para macaco cinomolgo (~125 ml /h/kg), lo que

indica que prácticamente no se produce la eliminación por filtración renal, como sería de esperar para una proteína de este peso molecular (109,3 kDa). Los volúmenes iniciales medios de distribución (V1) para animales de los Grupos 2, 3, 4, y 5, es similar o ligeramente mayor que el volumen de plasma en macaco cinomolgo (~45 ml/kg), lo que sugiere poco agotamiento de **DART-A** en el compartimento central mediante la unión a las células objeto. La fase beta media de vidas medias y MRT mostraron una tendencia creciente al aumentar la dosis con la vida media beta media ($t_{1/2,\beta}$) fue 161 horas (6.7 días) y el tiempo medio de residencia (MRT) fue de 191 horas (8 días). Es de destacar solamente tres animales del estudio GLP (n = 1 en 2/kg de grupos dosis mg; n = 2 en grupos de dosis 5 µg/kg) que tuvieron perfiles PK aberrantes siguiendo las 2da infusiones posteriores **DART-A** (n = 2) o siguiendo la cuarta infusión **DART-A** (n = 1) y se confirmaron positivas posteriormente para ADA. Por lo tanto, los datos de concentración de suero siguieron los ciclos de infusión afectados que se excluyeron del modelado PK para estos 3 animales.

Tabla 13 Análisis de Dos Compartimentos de Parámetros PK de DART-A en Macacos Cinomolgos				
Atributo	0.2 µg/kg/d (media ± DE)	2 µg/kg/d (media ± DE)	5 µg/kg/d (media ± DE)	10 µg/kg/d (media ± DE)
C _{max} (ng/mL)	3.18 ± 0.46	31.9 ± 3.0	82.9 ± 5.6	166.6 ± 11.0
AUC _{inf} (h*ng/mL)	155 ± 37	2258 ± 634	6714 ± 1846	13756 ± 2534
CL (mL/h/kg)	0.95 ± 0.17	0.80 ± 0.22	0.73 ± 0.24	0.70 ± 0.13
CLD ₂ (mL/h/kg)	0.87 ± 0.15	1.65 ± 0.36	1.70 ± 0.74	1.40 ± 0.40
V ₁ (mL/kg)	43.4 ± 5.8	50.9 ± 5.1	52.3 ± 3.5	54.5 ± 4.5
V ₂ (mL/kg)	65.3 ± 17.5	77.9 ± 17.9	93.4 ± 33.3	105.3 ± 33.0
V _{ss} (mL/kg)	108.7 ± 16.6	128.8 ± 17.2	145.8 ± 34.6	159.8 ± 36.0
t _{1/2} (h)	14.0 ± 1.5	11.0 ± 2.2	12.3 ± 3.8	15.0 ± 4.4
t _{1/2.β} (h)	119.1 ± 27.6	143.4 ± 43.4	184.9 ± 72.0	205.6 ± 66.9
MRT (h)	116.3 ± 20.3	173.0 ± 54.5	221.2 ± 86.5	235.9 ± 72.0

La Liberación de Citocina en Macaco Cinomolgo Tratados por DART-A

15 **[00241]** Las muestras de suero para evaluar los niveles de citocinas se recolectaron antes de la infusión y a las 2 y 22 horas después del final de la infusión en los Días 1, 8, 15, 22 y 29. Las citocinas evaluadas fueron TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10.

20 **[00242]** Se observó un aumento en los niveles de IL-6, IL-10, IFN-γ y TNF-α siguiendo la primera infusión **DART-A** (DÍA 8), con respecto al mayor incremento en niveles de citocinas que se producen 2 horas siguiendo el final de la infusión. Se observó un incremento dependiente de la dosis **DART-A** para IL-10 e IFN-γ

25 a niveles de dosis >2µg/kg, mientras que se observó un aumento

de IL-6 a niveles de dosis ≥ 5 $\mu\text{g/kg}$. Se observaron cambios en los niveles de TNF- α y fueron pequeños y sólo a nivel de dosis más elevado (10 mg/kg). Los cambios en los niveles de citocinas fueron transitorios y volvieron a la referencia en o cerca de dentro de las 24 horas al inicio de la infusión, y no hubo observaciones clínicas asociadas con este aumento de los niveles de citocinas. Infusiones posteriores de **DART-A** en los Días 15, 22 y 29 dieron como resultado aumentos más pequeños de nivel de citocinas, en general, comparables a los observados después del artículo de control de infusión. Los niveles medios de IL-2, IL-4 e IL-5 mostraron cambios variables y aislados en los animales individuales, pero se mantuvieron <20 pg/mL en todos los grupos durante toda la duración del estudio y no se consideraron toxicológicamente significativos.

15 **[00243]** Los niveles de citocinas en animales que recibieron 0.2 $\mu\text{g/kg}$ **DART-A** fueron comparables a las variaciones observadas siguiendo la a infusión del artículo de control (Grupo 1).

20 **Agotamiento Mediado por DART-A de células B en circulación en Macacos Cinomolgos**

[00244] Los niveles circulantes absolutos de células B, células T, incluyen subconjuntos de células T (CD4 vs CD8) y marcadores de activación (CD25, CD69, PD-1 y TIM-3), y las células NK, se midieron durante todo el estudio como un criterio de valoración farmacodinámico. Las muestras fueron recolectadas antes de la

25

infusión y a las 2, 22 y 70 horas después del final de la infusión en los Días 1, 8, 22 y 29, antes de la necropsia terminal en el Día 37, y luego semanalmente o quincenalmente durante el período de recuperación en los Días 36, 43, 50, 57, 64, 78, 92, 106 y 119.

5 [00245] La **Figura 28** muestra que el tratamiento **DART-A** resultó en una disminución dependiente de la dosis de células CD20+ B, la población objetivo pretendida. El agotamiento completo o casi completo de las células CD20+ se observó durante 24 horas tras el inicio de la primera infusión de **DART-A** a niveles de dosis $\geq$
10 2 $\mu\text{g/kg}$. El agotamiento de las células CD20+ B fue duradero durante todo el período de tratamiento y se mantuvo durante 3-5 semanas después de la dosis final. Existe un retorno dependiente de dosis a niveles previos a la dosis de células CD20+ B durante las últimas semanas del período de recuperación de 12 semanas.

15

Ejemplo 15

Agotamiento Autólogo de Células B Malignas en Muestras de Pacientes Primarias CLL

[00246] Para evaluar actividad citolítica mediada por **DART-A** en muestras de pacientes primarios de CLL, los pacientes PBMCs
20 se incubaron con **DART-A** o **Control DART 1**. Debido a la disponibilidad limitada muestra del paciente, sólo 2 concentraciones (50 ng/mL y 200 ng/mL) se probaron. Los porcentajes de células B de malignas CLL (CD19+/CD5+ o CD20+/CD5+) y células T (CD19-/CD5+ o CD4+ y CD8+) se midieron
25 mediante citometría de flujo antes del tratamiento y después del

tratamiento durante 3 y 6 días. **DART-A** en las concentraciones de bloques parcialmente probadas por tinción de anticuerpos anti-CD19, por lo tanto, no fue apropiado utilizar CD19+/CD5+ en células B malignas de compuerta después del tratamiento con

5 **DART-A**. Por lo tanto, el agotamiento de las células B malignas se determinó por colocación de compuertas en células CD20+/CD5+ siguiendo el tratamiento **DART-A**.

[00247] La proporción E:T se determinó a partir de la células B malignas CLL y la frecuencia de células T fue generalmente

10 $\leq 1:10$. En el experimento donante CLL representativo mostrado, la proporción de células E:T fue de aproximadamente 1:23 antes del tratamiento basado en células CD19-/células T CD5+ que comprenden sólo el 4% de las PBMCs totales y aproximadamente el 90% de los PBMCs identificados como células B malignas CD19+/CD5+. Las

15 **Figuras 29A-29I** y la **Tabla 14** muestran los efectos de tratamiento **DART-A** comparado con la muestra de pacientes CLL. La incubación de **DART-A** con PBMC CLL resultó en agotamiento dependiente del tiempo de las células B malignas en ambas concentraciones **DART-A** evaluadas, acompañadas por un aumento concomitante en las células

20 T (CD4 y CD8) observadas en el Día 6. Además, el marcador CD25 de activación de células T se sobrerregularon siguiendo el tratamiento **DART-A** durante 6 días, indicando el **DART-A** que induce la activación de células T en el proceso de exterminación redirigido de las células B malignas. En contraste, ninguna

25 exterminación de células B o sobrerregulación de CD25 se observó

con control DART 1 hasta el Día 6.

[00248] Es de destacarse que **DART-A** medía el mismo nivel de exterminación de ambas concentraciones evaluadas, pero el nivel de exterminación aumentó con el tiempo, con aproximadamente el 5 40% y 85% de las células B malignas que se exterminan en el Día 3 y el Día 6, respectivamente, lo que sugiere que el tiempo sea el factor crítico para la eliminación eficiente de las células objeto bajo las células T inferiores en las proporciones objetivo cuando este presente **DART-A** suficiente.

10

15

20

25

5

10

15

20

Tabla 14					
Porcentajes de Células B Malignas (CD20+/CD5+), células T (CD4, CD8+) y Células T activadas (CD25+/CD4+ y CD25+/CD8+) en PBMC CLL (E:T = 1:23) después de DART-A o Tratamiento Control DART 1 durante 3 y 6 Días					
Punto de Tiempo	Porcentajes (%)				
	CD20+/CD5+	CD4+	CD8+	CD25+/CD4+	CD25+/CD8+
Día 0					
Pretratamiento	70.7	n.d. ¹		Subconjuntos de célula T CD4+ y CD8+ no se midieron en el Día 0. CD19-/CD5+ se utilizó para definir la población de células T en el Día 0 (4%) como se describe en lo anterior.	
Día 3					
DART-A (50ng/mL)	40.5	1.01	1.78	Los porcentajes de células T globales fueron demasiado bajos (<5%) para evaluar CD 25 marcador de activación de células T el Día 0 o Día 3.	
Control DART 1 (50 ng/mL)	73.5	3.08	1.81		
DART-A (200 ng/mL)	42.3	1.61	1.68		
Control DART 1 (200 ng/mL)	72.9	3.23	1.62		
Día 6					
DART-A (50ng/mL)	11.3	57.4	22.2	87.7	82.8
Control DART 1 (50 ng/mL)	74.9	3.54	2.26	1.4	20.6
DART-A (200 ng/mL)	12.3	65.2	20.9	91.6	90.7
Control DART 1 (200 ng/mL)	73.4	2.79	1.82	1.4	14.3

[00249] Todas las publicaciones y patentes mencionadas en esta especificación se incorporan en la presente para referencia al mismo grado como si cada publicación individual o solicitud de

patente fuera específica e individualmente indicada para incorporarse para referencia en su totalidad. Aunque la invención se ha descrito en relación con las modalidades específicas de la misma, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales y esta solicitud está destinada a cubrir cualesquiera variaciones, usos, o adaptaciones de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención y que incluyen tales desviaciones de la presente descripción como vienen dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y como puede aplicarse a las características esenciales establecidas en lo sucesivo.