

SEÑOR DIRECTOR
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

Asunto: **Solicitud No.:** **16-057695**
Oficio No.: **9507**
Referencia: **Respuesta examen de**
patentabilidad

MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO, identificado como aparece al pie de mi firma, en calidad de apoderado de la sociedad solicitante **MACROGENICS, INC.**, doy respuesta al **Oficio No. 9507**, de conformidad con el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

1. MODIFICACIONES A LA SOLICITUD

Con el fin de atender las observaciones realizadas por el Examinador, el solicitante aporta un nuevo capítulo reivindicatorio conformado por 16 reivindicaciones en las que se han incluido las siguientes modificaciones:

- 1.1. El preámbulo de las reivindicaciones 9 y 10 se ha modificado, para ahora referirse al *"diacuerpo monovalente biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-2"*.
- 1.2. La antigua reivindicación 14 ha sido eliminada del pliego reivindicatorio.
- 1.3. La antigua reivindicación 15 (nueva reivindicación 14) se ha modificado de manera que ahora menciona las posibles secuencias de aminoácidos del polinucleótido reivindicado.
- 1.4. La antigua reivindicación 16 (nueva reivindicación 15) se ha modificado para ahora divulgar un anticuerpo o una porción o fragmento polipeptídico del mismo, debidamente caracterizado por sus seis CDRs.
- 1.5. Se ha incluido una nueva reivindicación 16, que se divulga una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o una porción o fragmento polipeptídico del mismo de la reivindicación 15 y un portador fisiológicamente aceptable. Esta nueva reivindicación encuentra soporte,

por ejemplo, en la página 22 de la descripción de la solicitud y en la reivindicación 13 originalmente presentada.

Adicionalmente, el solicitante aporta un capítulo descriptivo modificado, ya que se identificó que el péptido con secuencia GGG se había identificado por equivocación como SEQ ID NO: 33 en varias partes de la descripción. Sin embargo, la SEQ ID NO: 33 también referencia de manera correcta la secuencia GGGNS en la descripción. Teniendo en cuenta que la secuencia GGG sólo tiene tres aminoácidos de longitud, no se requiere un SEQ ID NO para identificarla. De esta manera, en la descripción, siempre que se describe el ligador 5, se eliminaron las referencias a la SEQ ID NO: 33 y se reemplazaron por "GGG". La reivindicación 3 fue modificada de manera similar para corregir esta inconsistencia.

Estas modificaciones se ajustan al artículo 34 de la Decisión 486 de 2000 y no constituyen una ampliación de la materia contenida en la solicitud originalmente presentada.

2. ARGUMENTOS A FAVOR DE LA CLARIDAD DE LAS REIVINDICACIONES

- 2.1. El Examinador menciona que la reivindicación 8 no es clara porque no menciona el tipo de variante realizada sobre los dominios CH2 y CH3. Sin embargo, se debe tener en cuenta que incluir esta información en la reivindicación, llevaría a una limitación indebida del alcance de protección de la misma. Se debe tener en cuenta que la reivindicación 8 es dependiente de las reivindicaciones 3 o 4, las cuales divulgan las secuencias de aminoácidos específicas de los dominios de cadena pesada y cadena ligera de las moléculas de la presente invención. Por consiguiente, la reivindicación 8 también incluye estas características, particularmente las secuencias de aminoácidos específicas de los dominios de cadena pesada y cadena ligera de la molécula que se pretende proteger. Por consiguiente, es claro que la reivindicación 8 ya comprende suficientes características estructurales que definen apropiadamente el diacuerpo que se reivindica.
- 2.2. Al haber modificado el preámbulo de las reivindicaciones 9 y 10, se debe dar por superada la objeción realizada a las mismas.
- 2.3. Al haber eliminado la reivindicación 14, la objeción hacia la misma debe verse superada.

- 2.4. Con respecto a la reivindicación 16 (nueva reivindicación 15), se debe tener en cuenta que la misma ya no divulga una célula, sino que menciona un anticuerpo o una porción o fragmento polipeptídico del mismo, debidamente caracterizado por las secuencias de aminoácidos de los seis CDRs. Por consiguiente, amablemente se solicita al Señor Examinador considerar superada la objeción correspondiente.
- 2.5. La antigua reivindicación 15, (nueva reivindicación 14) se encuentra debidamente caracterizada al definir un polinucleótido por sus posibles secuencias de aminoácidos. Siendo así las cosas, se debe dar por superada la objeción hacia la misma.

3. ESTADO DE LA TÉCNICA

El Examinador determinó como estado de la técnica más cercano a la invención el documento titulado "*CD3-binding molecules capable of binding to human and non-human CD3*" (D1 - WO2012162067), el documento titulado "*Covalent diabodies and uses thereof*" (D2 - WO2012018687) y el documento titulado "*Deimmunized serum-binding domains and their use for extending serum half-life*" (D3 - US20100174053).

4. ARGUMENTOS A FAVOR DEL NIVEL INVENTIVO DE LA INVENCION

- 4.1. El Examinador reconoce que D1 no logra mencionar un diacuerpo específico que comprenda los dominios de cadena pesada y cadena ligera que se definen por las secuencias de aminoácidos recitadas en las presentes reivindicaciones. Sin embargo, el Señor Examinador asegura que los diacuerpos reivindicados son alternativas a las moléculas divulgadas por D1 y no muestran características técnicas inesperadas.
- 4.2. Además, el Examinador asegura que D2 divulga una molécula de diacuerpo que incluye una porción polipeptídica de una proteína que se une al suero y que D3 divulga una molécula de diacuerpo que incluye un dominio Fc. El Examinador concluye que las características de las reivindicaciones 2 y 3 carecen de nivel inventivo en vista de D1 a D3, en combinación.
- 4.3. Amablemente se solicita al Examinador reconsiderar lo anterior, teniendo en cuenta los siguientes argumentos.

- 4.4. En primer lugar, se debe tener en cuenta que el solicitante de la presente solicitud de patente es el solicitante de las patentes correspondientes a los documentos D1, D2 y D3, y se encuentra entonces completamente familiarizado con sus divulgaciones. D1 se encuentra dirigido a dos variantes diferentes humanizadas de dos moléculas murinas anti-CD3 (mAb2 y mAb1), las cuales son capaces de unirse a CD3 humano o no humano. La cadena ligera variable y la cadena pesada variable de los anticuerpos murinos mencionados en dicha anterioridad fueron humanizadas para generar variantes de cadena pesada y de cadena ligera humanizadas que incluyen marcos y/o residuos de CDRs distintos.
- 4.5. La presente solicitud de patente se encuentra dirigida a diacuerpos bi-específicos capaces de unirse específicamente a un epítipo de gpA33 y a un epítipo de CD3, y que comprende al menos dos cadenas polipeptídicas unidas covalentemente uno con la otra, en donde:
- Una de las cadenas polipeptídicas comprende una secuencia de aminoácidos que abarca la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos de cualquiera de un dominio K-coli (SEQ ID NO: 4) o un dominio E-coli (SEQ ID NO: 3) y un ligando peptídico (SEQ ID NO: 2); y
 - Otra de las cadenas polipeptídicas comprende una secuencia de aminoácidos que abarca la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos de cualquiera de un dominio K-coli (SEQ ID NO: 4) o un dominio E-coli (SEQ ID NO: 3) y un ligando peptídico (SEQ ID NO: 2), en donde los dominios objetivo de la primera y la segunda cadena polipeptídica no son ambos dominios E-coli o ambos dominios K-coli (como se divulga en las reivindicaciones y como se especifica en las secuencias de aminoácidos).
- 4.6. La Fig. 1 de la presente solicitud ilustra una estructura que ejemplifica de un diacuerpo bi-específico monovalente que comprende una primera y una segunda cadena polipeptídica de acuerdo con una modalidad divulgada. Esta figura se reproduce aquí abajo:

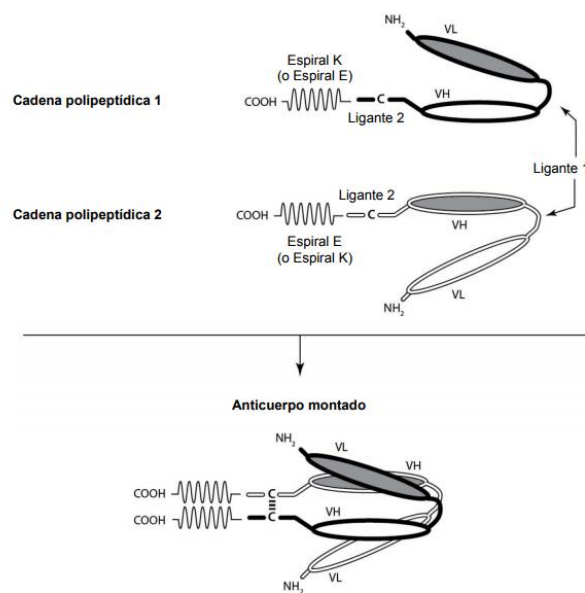


Figura 1

4.7. Como se puede notar en la presente solicitud, se han descrito diacuerpos en el estado de la técnica, exhibiendo especificidad para alguno o para ambos gpA33 y CD3. Sin embargo, la producción de diacuerpos heterodiméricos funcionales puede ser mejorada aún más mediante la consideración y ubicación cuidadosa de los dominios empleados en las cadenas polipeptídicas. La presente invención se encuentra entonces dirigida a diacuerpos optimizados que incluyen cadenas polipeptídicas específicas que comprenden dominios que se orientan y diseñan para formar, por medio de enlaces covalentes, diacuerpos heterodiméricos y diacuerpos Fc heterodiméricos que son capaces de unirse simultáneamente a gpA33 y CD3, y que exhiben funcionalidad superior, en comparación con moléculas previas. Esto se puede evidenciar en la Figura 3 y en la página 12 de la descripción de la presente solicitud.

4.8. Las moléculas de diacuerpo gpA33 x CD3 de la presente invención median la matanza superior de células cancerígenas en comparación con las moléculas del estado de la técnica que tienen como blanco gpA33 y CD3. Con respecto a lo anterior, se le llama la atención al Señor Examinador al ejemplo 5 de la solicitud, que demuestra que los diacuerpos de la presente invención mediaron cerca del 40% de citotoxicidad para las células de cáncer colo205. Se le pide al Examinador remitirse a la página 76 de la descripción y figura 6B; también ver la Tabla 4 que demuestra que las moléculas de diacuerpos de la presente invención mediaron la citotoxicidad en contra de múltiples líneas celulares cancerígenas. En contraste, las moléculas de diacuerpo gpA33 x CD3 divulgadas por D1

demonstraron citotoxicidad de cerca del 20% de células colo205 (por ejemplo, ver D1, párrafo 00316 y Figura 12C). Por consiguiente, el aumento en porcentaje de citotoxicidad demostrado por los diacuerpos de la presente invención, en comparación con las moléculas del estado de la técnica es significativo.

- 4.9. Además, la administración de los diacuerpos de gpA33 x CD3 de la presente invención mediaron una reducción dramática en el volumen de tumor. Con respecto a lo anterior, se llama la atención del Examinador a los ejemplos 7 y 8 de la presente solicitud. En este orden de ideas, se considera que las moléculas actualmente reivindicadas son patentables y distinguibles de las moléculas del estado la técnica. De hecho, las presentes reivindicaciones fueron consideradas novedosas e inventivas en vista de D1 por la Autoridad Internacional de Búsqueda (por favor remitirse a la Opinión Escrita, Caja No. V, primera página).
- 4.10. Como menciona el Examinador, D2 divulga una molécula de diacuerpo que incluye un dominio que se une a albúmina y D3 menciona una molécula de diacuerpo que incluye un dominio Fc. Sin embargo, D2 y D3 no logran divulgar o sugerir una molécula de diacuerpo que incluya las características estructurales y la funcionalidad superior de los diacuerpos actualmente reivindicados como se ha explicado anteriormente. Por consiguiente, D2 y D3 no logran remediar las deficiencias de D1 y del resto del estado de la técnica.
- 4.11. Por lo anterior, amablemente se le solicita al Señor Examinador reconocer que la presente invención es novedosa e inventiva frente a D1, D2 y D3, individualmente y en combinación.

5. PETICIÓN

- 5.1. Teniendo en cuenta que se ha dado respuesta a todas las observaciones realizadas por su Despacho, demostrando que el nuevo pliego reivindicatorio cumple con los requisitos de patentabilidad, amablemente se solicita proceder al otorgamiento de la solicitud de patente.
- 5.2. De manera subsidiaria y teniendo en cuenta que se han realizado modificaciones a las reivindicaciones y que la solicitud de patente de referencia fue publicada el 10 de junio de 2016 (estando así dentro de los 18 meses siguientes a la publicación), se solicita a su Despacho realizar un

examen de patentabilidad adicional, si considera que los argumentos y modificaciones presentados no son suficientes para superar las objeciones trasladadas mediante el Oficio No. 9507. Para lo anterior se realiza el pago en línea de la tasa correspondiente de manera simultánea a la radicación del presente escrito.

6. ANEXOS

Adjunto al presente escrito:

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 16 reivindicaciones;
- Capítulo descriptivo modificado;
- Pago en línea por concepto de examen de patentabilidad adicional.

7. NOTIFICACIONES

Recibiré notificaciones en la secretaría de su Despacho; en mis oficinas de abogado ubicadas en la Calle 67 No. 7 – 35, oficina 1204, teléfono 3192900, fax 3210295, Bogotá D.C., Colombia, o; al correo electrónico patentes@gpzlegal.com.

Atentamente,

MAURICIO JARAMILLO C.
C.C. 80.421.942 de Bogotá
T.P. 74.555 del C.S.J.

GEC

REIVNDICACIONES MODIFICADAS

1. Un diacuerpo monovalente biespecífico, donde dicho diacuerpo monovalente biespecífico puede unirse a un epítipo de gpA33 y a un epítipo de CD3, donde el diacuerpo monovalente biespecífico comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, donde dichas primera y segunda cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí, y donde:

A. la primera cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende un subdominio (1A) que, a su vez, comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:5**), y un subdominio (1B) que, a su vez, comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (VH_{gpA33}) (**SEQ ID NO:27**); donde dichos subdominios (1A) y (1B) están separados uno del otro por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:1**);

ii. un dominio 2, donde dicho dominio 2 es un dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**) o un dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**), donde dicho dominio 2 está separado de dicho dominio 1 por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:2**);

B. la segunda cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende un subdominio (1A) que, a su vez, comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (VL_{gpA33}) (**SEQ ID NO:26**); y un subdominio (1B) que, a su vez, comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:25**); donde dichos subdominios (1A) y (1B) están separados uno del otro por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:1**);

ii. un dominio 2, donde dicho dominio 2 es un dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**) o un dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**), donde dicho dominio 2 está separado de dicho dominio 1 por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:2**); y donde dicho dominio 2 de dicha primera cadena polipeptídica y dicho dominio 2 de dicha segunda cadena polipeptídica no son ambos dominios enrollados E ni son ambos dominios enrollados K;

y donde:

(a) dicho dominio VL de dicha primera cadena polipeptídica y dicho dominio VH de dicha segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a un epítipo de CD3 específico; y

(b) dicho dominio VH de dicha primera cadena polipeptídica y dicho dominio VL de dicha segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a un epítipo de gpA33 específico.

2. El diacuerpo monovalente biespecífico de la reivindicación 1, donde dicha primera cadena polipeptídica o la segunda cadena polipeptídica comprende un dominio de unión a albúmina (**SEQ ID NO:34**), dicho dominio de unión a albúmina posicionado en sentido del extremo C-terminal con respecto a dicho dominio 2 y separado de dicho dominio 2 por un ligador 3 (**SEQ ID NO:32**).

3. Un diacuerpo Fc monovalente biespecífico, donde dicho diacuerpo Fc monovalente biespecífico puede unirse a un epítipo de gpA33 específico y a un epítipo de CD3 específico, y posee un dominio Fc IgG, donde el diacuerpo Fc monovalente biespecífico comprende una primera cadena polipeptídica, una segunda cadena polipeptídica y una tercera cadena polipeptídica, donde dichas primera y segunda cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí y dichas primera y tercera cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí, y donde:

A. la primera cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende un subdominio (1A) que, a su vez, comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (VL_{gpA33}) (**SEQ ID NO:26**); y un subdominio (1B) que, a su vez, comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:25**); donde dichos subdominios (1A) y (1B) están separados uno del otro por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:1**);

ii. un dominio 2, donde dicho dominio 2 es un dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**) o un dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**), donde dicho dominio 2 está separado de dicho dominio 1 por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:2**); y

iii. un dominio 3, que comprende un subdominio (3A) que, a su vez, comprende un péptido que contiene cisteína (péptido 1) (**SEQ ID NO:39**); y un subdominio (3B) que, a su vez, comprende una porción polipeptídica de un dominio Fc de IgG con los dominios CH2 y CH3 de un dominio Fc de IgG; donde dichos dominios 3 y 2 están separados uno del otro por un espaciador peptídico que tiene secuencia GGG (ligador 5);

B. la segunda cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende un subdominio (1A) que, a su vez, comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:5**), y un subdominio (1B) que, a su vez, comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (VH_{gpA33}) (**SEQ ID NO:27**); donde dichos subdominios (1A) y (1B) están separados uno del otro por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:1**);

ii. un dominio 2, donde dicho dominio 2 es un dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**) o un dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**), donde dicho dominio 2 está separado de dicho dominio 1 por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:2**); y donde dicho dominio 2 de dicha primera cadena polipeptídica y dicho dominio 2 de dicha segunda cadena polipeptídica no son ambos dominios enrollados E ni son ambos dominios enrollados K; y

C. la tercera cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal, un dominio 3 que comprende:

(1) un subdominio (3A) que, a su vez, comprende un péptido que contiene cisteína (péptido 1) (**SEQ ID NO:39**); y

(2) un subdominio (3B) que, a su vez, comprende una porción polipeptídica de un dominio Fc de IgG con los dominios CH2 y CH3 de un dominio Fc de IgG;

y donde:

(a) dichas porciones polipeptídicas de los dominios Fc de IgG de dichas primera y tercera cadenas polipeptídicas forman dicho dominio Fc de IgG;

(b) dicho dominio VL de dicha primera cadena polipeptídica y dicho dominio VH de dicha segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a un epítipo de gpA33 específico; y

(c) dicho dominio VH de dicha primera cadena polipeptídica y dicho dominio VL de dicha segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a un epítipo de CD3 específico.

4. Un diacuerpo Fc monovalente biespecífico, donde dicho diacuerpo Fc monovalente biespecífico puede unirse a un epítipo de gpA33 específico y a un epítipo de CD3 específico, y posee un dominio Fc IgG, donde el diacuerpo Fc monovalente biespecífico comprende una primera cadena polipeptídica, una segunda cadena polipeptídica y una tercera cadena polipeptídica, donde dichas primera y segunda cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí y dichas primera y tercera cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí, y donde:

A. la primera cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i. un dominio 3, que comprende un subdominio (3A) que, a su vez, comprende un péptido que contiene cisteína (péptido 1) (**SEQ ID NO:39**); y un subdominio (3B) que, a su vez, comprende una porción polipeptídica de un dominio Fc de IgG con los dominios CH2 y CH3 de un dominio Fc de IgG;

ii. un dominio 1, que comprende un subdominio (1A) que, a su vez, comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (VL_{gpA33}) (**SEQ ID NO:26**); y un subdominio (1B) que, a su vez, comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:25**); donde dichos subdominios (1A) y (1B) están separados uno del otro por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:1**);

donde dichos dominios 1 y 3 están separados uno del otro por un espaciador peptídico (ligador 4) (**SEQ ID NO:38**);

iii. un dominio 2, donde dicho dominio 2 es un dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**) o un dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**), donde dicho dominio 2 está separado de dicho dominio 1 por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:2**); y B. la segunda cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende un subdominio (1A) que, a su vez, comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:5**), y un subdominio (1B) que, a su vez, comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (VH_{gpA33}) (**SEQ ID NO:27**); donde dichos subdominios (1A) y (1B) están separados uno del otro por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:1**);

ii. un dominio 2, donde dicho dominio 2 es un dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**) o un dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**), donde dicho dominio 2 está separado de dicho dominio 1 por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:2**); y donde dicho dominio 2 de dicha primera cadena polipeptídica y dicho dominio 2 de dicha segunda cadena polipeptídica no son ambos dominios enrollados E ni son ambos dominios enrollados K; y

C. la tercera cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal, un dominio 3 que comprende:

(1) un subdominio (3A) que, a su vez, comprende un péptido que contiene cisteína (péptido 1) (**SEQ ID NO:39**); y

(2) un subdominio (3B) que, a su vez, comprende una porción polipeptídica de un dominio Fc de IgG con los dominios CH2 y CH3 de un dominio Fc de IgG;

y donde:

(a) dichas porciones polipeptídicas de los dominios Fc de IgG de dichas primera y tercera cadenas polipeptídicas forman dicho dominio Fc de IgG;

(b) dicho dominio VL de dicha primera cadena polipeptídica y dicho dominio VH de dicha segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a un epítipo de gpA33 específico; y

(c) dicho dominio VH de dicha primera cadena polipeptídica y dicho dominio VL de dicha segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a un epítipo de CD3 específico.

5. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, donde dicho subdominio (3B) de dicha primera cadena polipeptídica comprende una secuencia diferente de la de dicho subdominio (3B) de dicha tercera cadena polipeptídica.

6. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de la reivindicación 5, donde dicho subdominio (3B) de dicha primera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:40** y dicho subdominio (3B) de dicha tercera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:41**.

7. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de la reivindicación 5, donde dicho subdominio (3B) de dicha primera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:41** y dicho subdominio (3B) de dicha tercera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:40**.

8. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, donde dicho dominio 3 de dicha primera cadena polipeptídica y/o dicho dominio 3 de dicha tercera cadena polipeptídica comprenden una variante de secuencia CH2-CH3 que exhibe una unión modificada a un receptor Fcγ.

9. El diacuerpo monovalente biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 o el diacuerpo Fc monovalente biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, donde dicho dominio 2 de dicha primera cadena polipeptídica comprende un enrollado E (**SEQ ID NO:3**), y dicho dominio 2 de dicha segunda cadena polipeptídica comprende un enrollado K (**SEQ ID NO:4**).

10. El diacuerpo monovalente biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o el diacuerpo Fc monovalente biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, donde dicho dominio 2 de dicha primera cadena polipeptídica comprende un enrollado K (**SEQ ID NO:4**), y dicho dominio 2 de dicha segunda cadena polipeptídica comprende un enrollado E (**SEQ ID NO:3**).

11. Un diacuerpo monovalente biespecífico, donde dicho diacuerpo monovalente biespecífico puede unirse a un epítipo de CD3 y a un epítipo de GPA33, donde dicho diacuerpo monovalente biespecífico comprende:

(1) una primera cadena polipeptídica con la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:28**, y una segunda cadena polipeptídica con tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:30**; o

(2) una primera cadena polipeptídica con la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:35**, y una segunda cadena polipeptídica con tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:30**;

donde dicha primera y dicha segunda cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí por un enlace de disulfuro.

12. Un diacuerpo Fc monovalente biespecífico, donde dicho diacuerpo Fc monovalente biespecífico puede unirse a un epítipo de CD3 y a un epítipo de gpA33, y posee un dominio Fc de IgG, donde dicho diacuerpo Fc monovalente biespecífico comprende:

(1) una primera cadena polipeptídica con la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:42**, una segunda cadena polipeptídica con tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:44** y una tercera cadena polipeptídica con tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:46**; o

(2) una primera cadena polipeptídica con la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:48**, una segunda cadena polipeptídica con tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:28** y una tercera cadena polipeptídica con tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:46**;

donde dicha primera y dicha segunda cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí por un primer enlace de disulfuro y dichas primera y tercera cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí por un segundo enlace de disulfuro.

13. Una composición farmacéutica que comprende el diacuerpo monovalente biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 o 9 a 11 o el diacuerpo Fc monovalente biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10 o 12; y un vehículo fisiológicamente aceptable.

14. Un polinucleótido que codifica una cadena de polipéptido de un diacuerpo biespecífico, que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID

NO: 29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47.

15. Un anticuerpo o una porción o fragmento polipeptídico del mismo, donde el anticuerpo se une a gpA33, y donde el anticuerpo o la porción o fragmento polipeptídico del mismo comprende:

(1) CDR1 (**SEQ ID NO:14**), CDR2 (**SEQ ID NO:15**) y CDR3 (**SEQ ID NO:16**) de una cadena ligera de un anticuerpo anti-gpA33 humano;

(2) CDR1 (**SEQ ID NO:18**), CDR2 (**SEQ ID NO:19**) y CDR3 (**SEQ ID NO:20**) de una cadena pesada de un anticuerpo anti-gpA33 humano; o

(3) ambos, (1) y (2).

16. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o la porción o fragmento polipeptídico del mismo de la reivindicación 15 y un portador fisiológicamente aceptable.

DIACUERPOS MONOVALENTES BIESPECÍFICOS QUE PUEDEN UNIRSE A gpA33 Y CD3, Y SUS USOS

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas:

Esta solicitud reivindica prioridad para las solicitudes de patente de Estados Unidos nº 61/869.528 (presentada el 23 de agosto de 2013; pendiente) y 61/907.691 (presentada el 22 de noviembre de 2013; pendiente), y la solicitud de patente europea nº 13198859 (presentada el 20 de diciembre 2013), cada una de las cuales, en su totalidad, se incorpora al presente, a modo de referencia.

Referencia a listas de secuencias:

La presente solicitud incluye una o más listas de secuencias en virtud de 37 CFR 1.821 y ss., que se presentan en papel y medios legibles por computadora, y cuyas versiones en papel y legibles por computadora se incorporan en su totalidad al presente, a modo de referencia.

Antecedentes de la invención:

Campo de la invención:

La presente invención se refiere a diacuerpos monovalentes biespecíficos que comprenden dos cadenas polipeptídicas y poseen un sitio de unión específico a un epítipo de gpA33 y un sitio de unión específico a un epítipo de CD3 (es decir, un «diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3»). La presente invención se refiere además a diacuerpos monovalentes biespecíficos que comprenden un dominio Fc de inmunoglobulina («diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos»), están compuestos de tres cadenas polipeptídicas y poseen al menos un sitio de unión específico a un epítipo de gpA33 y un sitio de unión específico a un epítipo de CD3 (es decir, un «diacuerpo Fc monovalente biespecífico gpA33 x CD3»). Los diacuerpos monovalentes biespecíficos y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención pueden unirse simultáneamente a gpA33 y

CD3. La invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen tales diacuerpos monovalentes biespecíficos o tales diacuerpos Fc monovalente biespecíficos. La invención se refiere además a los métodos para el uso de tales diacuerpos en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades y afecciones.

Descripción de la técnica relacionada:

gpA33

El cáncer colorrectal es una de las malignidades más comunes del mundo occidental y es una de las principales causas de muerte por cáncer (Silverberg, E. et al. (1989) "Cancer Statistics, 1989," CA Cancer J Clin. 39(1):3-20). Un objetivo potencialmente útil en el cáncer de colon es la 43 kD glicoproteína transmembranal A33 (gpA33) (Heath, J.K. et al. (1997) "The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily," Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 94(2):469-474; Ritter, G. et al. (1997) "Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium," Biochem. Biophys. Res. Commun. 236(3):682-686). La gpA33 fue descubierta por primera vez a través de la producción de anticuerpos monoclonales murinos contra la línea de carcinoma pancreático humano derivado de células AsPC1. Se encontró que un anticuerpo (MAb A33) reaccionaba con una proteína de la superficie celular de 43 kDa, que se designó en consecuencia como «gpA33» (Wong, N.A. et al. (2006) "EpCAM and gpA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia," J. Clin. Pathol. 59(3):260-263).

gpA33 es una proteína transmembranal de la familia de moléculas de adhesión de unión; Abud, H.E. et al. (2000) "The Murine A33 Antigen Is Expressed At Two Distinct Sites During Development, The ICM Of The Blastocyst And The

Intestinal Epithelium," Mech. Dev. 98(1-2):111-114; Barendswaard, E.C. et al. (1998) "Rapid And Specific Targeting Of Monoclonal Antibody A33 To A Colon Cancer Xenograft In Nude Mice," Int. J. Oncol. 12(1):45-53; Panjideh, H. et al. (2008) "Biodistribution And Efficacy Of [131I]A33scFv::CDy, A Recombinant Antibody-Enzyme Protein For Colon Cancer," Int. J. Oncol. 32(4):925-930). Aunque todavía no se comprende la importancia funcional del antígeno A33, se ha demostrado que media la reparación de la mucosa del colon en un modelo animal de colitis y se expresa de forma homogénea en >95 % de todos los carcinomas colorrectales. La expresión del A33 es uniforme tanto en todos los estadios de la enfermedad como todos los grados de diferenciación histológica, y el antígeno no se secreta ni disemina de forma detectable en el torrente sanguíneo (Infante, J.R. et al. (2013) "Safety, Pharmacokinetics And Pharmacodynamics Of The Anti-A33 Fully-Human Monoclonal Antibody, KRN330, In Patients With Advanced Colorectal Cancer," Eur. J. Cancer. 49(6):1169-1175; Panjideh, H. et al. (2008) "Biodistribution And Efficacy Of [131I]A33scFv::CDy, A Recombinant Antibody-Enzyme Protein For Colon Cancer," Int. J. Oncol. 32(4):925-930). Por el contrario, se identificaron solo unos pocos ejemplos de expresión no gastrointestinal del antígeno A33 (Johnstone, C.N. et al. (2000) "Characterization Of Mouse A33 Antigen, A Definitive Marker For Basolateral Surfaces Of Intestinal Epithelial Cells," Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 279(3):G500-G510).

En vista de la expresión altamente restringida del antígeno A33, los investigadores estudiaron la posibilidad de tratamiento con anticuerpos de los cánceres asociados con el A33 (Infante, J.R. et al. (2013) "Safety, Pharmacokinetics And Pharmacodynamics Of The Anti-A33 Fully-Human Monoclonal Antibody, KRN330, In Patients With Advanced Colorectal

Cancer," *Eur. J. Cancer*. 49(6):1169-1175; Ackerman, M.E. et al. (2008) "A33 Antigen Displays Persistent Surface Expression," *Cancer Immunol. Immunother.* 57(7):1017-1027; Barendswaard, E.C. et al. (2001) "Relative Therapeutic Efficacy Of (125)I- And (131)I-Labeled Monoclonal Antibody A33 In A Human Colon Cancer Xenograft," *J. Nucl. Med.* 42(8):1251-1256; Carrasquillo, J.A. et al. (2011) "(124)I-huA33 Antibody PET Of Colorectal Cancer," *J. Nucl. Med.* 52(8):1173-1180; Chong, G. et al. (2005) "Phase I Trial Of 131I-HuA33 In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma," *Clin. Cancer Res.* 11(13):4818-4826; Deckert, P.M. et al. (2000) "Pharmacokinetics And Microdistribution Of Polyethylene Glycol-Modified Humanized A33 Antibody Targeting Colon Cancer Xenografts," *Int. J. Cancer*. 87(3):382-390; Johnston, A.P. et al. (2012) "Targeting Cancer Cells: Controlling The Binding And Internalization Of Antibody-Functionalized Capsules" *ACS Nano*. 6(8):6667-6674; Koppe, M.J. et al. (2005) "Radioimmunotherapy And Colorectal Cancer," *Br. J. Surg.* Mar;92(3):264-276; Sakamoto, J. et al. (2006) "A Phase I Radioimmunolocalization Trial Of Humanized Monoclonal Antibody HuA33 In Patients With Gastric Carcinoma," *Cancer Sci.* 97(11):1248-1254; Scott, A.M. et al. (2005) "A Phase I Trial Of Humanized Monoclonal Antibody A33 In Patients With Colorectal Carcinoma: Biodistribution, Pharmacokinetics, And Quantitative Tumor Uptake," *Clin. Cancer Res.* 11(13):4810-4817; Tschmelitsch, J. et al. (1997) "Enhanced Antitumor Activity Of Combination Radioimmunotherapy (¹³¹I-Labeled Monoclonal Antibody A33) With Chemotherapy (Fluorouracil)," *Cancer Res.* 57(11):2181-2186).

Asimismo, se evaluaron también fragmentos de dichos anticuerpos en cuanto a su potencial papel terapéutico (Coelho, V. et al. (2007) "Design, Construction, And In Vitro Analysis Of A33scFv::CDy, A Recombinant Fusion Protein For

Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy In Colon Cancer," Int. J. Oncol. 31(4):951-957).

CD3

El CD3 es un correceptor de células T compuesto de cuatro cadenas diferentes (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; pages 1-14; Chetty, R. et al. (1994) "*CD3: Structure, Function And The Role Of Immunostaining In Clinical Practice*," J. Pathol. 173:303-307).

En mamíferos, el complejo CD3 contiene una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ y dos cadenas CD3 ϵ . Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como el receptor de células T (TCR), con el fin de generar una señal de activación en linfocitos T. En ausencia de CD3, los TCR no se ensamblan correctamente y se degradan (Thomas, S. et al. (2010) "*Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer*," Immunology 129(2):170-177). CD3 se encuentra unido a las membranas de todas las células T maduras y en prácticamente ningún 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 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).

Diacuerpos biespecíficos

La capacidad de un anticuerpo intacto, sin modificar (por ejemplo, una IgG) para unirse a un epítipo de

un antígeno depende la presencia de dominios variables de cadenas livianas y pesadas de inmunoglobulina (es decir, los dominios VL y VH, respectivamente). El diseño de un diacuerpo se basa en el constructo Fv de cadena sencilla (scFv) (véase, por ejemplo, Holliger et al. (1993) *"'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,"* Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 90:6444-6448; US Patent Publication No. 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) *"A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The 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 Region,"* Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) *"Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,"* Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) *"Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy,"* Cancer Res. 69(12):4941-4944).

La interacción entre una cadena ligera y una cadena pesada del anticuerpo y, en particular, la interacción de sus dominios VL y VH, forma uno de los sitios de unión a epítipo del anticuerpo. Por el contrario, el constructo scFv comprende un dominio VL y VH de un anticuerpo contenido en

una única cadena polipeptídica en la que los dominios están separados por un ligador flexible de una longitud suficiente para permitir el autoensamblaje de los dos dominios en un sitio de unión a epítipo funcional. Cuando el autoensamblaje de los dominios VL y VH resulta imposible debido a un ligador de longitud insuficiente (menos de aproximadamente 12 residuos de aminoácidos), dos de los constructos scFv interactúan entre sí para formar una molécula bivalente, en la cual el VL de una cadena se asocia con el VH de la otra (revisado en Marvin *et al.* (2005) "*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*," *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658).

Los anticuerpos naturales pueden unirse a una sola especie de epítipo (es decir, son monoespecíficos), a pesar de que se pueden unir a múltiples copias de dicha especie (es decir, exhiben bivalencia o multivalencia). La técnica ha observado la capacidad de producir diacuerpos que difieren de estos anticuerpos naturales porque pueden unirse a dos o más especies diferentes de epítopos (es decir, exhiben 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. (EE. UU.)* 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger *et al.*); US 2004/0220388 (Mertens *et al.*); Alt *et al.* (1999) *FEBS Lett.* 454(1-2):90-94; Lu, D. *et al.* (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The 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.*); Mertens, N. *et al.*, "New Recombinant Bi- and Trispecific Antibody Derivatives," En: *NOVEL FRONTIERS IN THE PRODUCTION OF COMPOUNDS FOR BIOMEDICAL USE*, A. VanBroekhoven *et al.* (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The

Netherlands (2001), pages 195-208; 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 Region," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res. 69(12):4941-4944).

La provisión de diacuerpos no monoespecíficos proporciona una ventaja significativa: la capacidad de coligar y colocalizar células que expresan diferentes epítomos. De modo que los diacuerpos bivalentes tienen aplicaciones de amplio alcance, incluidos tratamientos e inmunodiagnóstico. La bivalencia permite una gran flexibilidad en el diseño y la ingeniería del diacuerpo para diversas aplicaciones, proporcionando una mayor avidéz a antígenos multiméricos, entrecruzamiento de antígenos diferentes, y orientación directa a tipos celulares específicos que dependen de la presencia de ambos antígenos blanco. Debido a su mayor valencia, bajas tasas de disociación y eliminación rápida de la circulación (en caso de diacuerpos de pequeño tamaño, de ~ 50 kDa o menos), las moléculas de los diacuerpos conocidos en la técnica también demostraron un uso particular en el campo de imágenes de tumores (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*," Protein Eng. 10:1221). De particular importancia es la coligadura de células diferentes, por ejemplo, la unión cruzada entre células T citotóxicas y células tumorales

(Staerz et al. (1985) "*Hybrid Antibodies Can 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).

Los dominios de unión a epítipo de los diacuerpos también pueden ser dirigidos a un determinante de superficie de cualquier célula efectora inmunitaria, tal como CD3, CD16, CD32 o CD64, que se expresan en los linfocitos T, células asesinas naturales (NK) u otras células mononucleares. En muchos estudios, se halló que la unión de diacuerpos a determinantes de células efectoras, por ejemplo, receptores Fcγ (FcγR), también activan la célula efectora (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 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 es desencadenada por la unión de un anticuerpo unido a un antígeno a una célula efectora, a través de la interacción Fc-FcγR; por lo tanto, en este sentido, las moléculas del diacuerpo de la invención pueden exhibir una funcionalidad similar a Ig independientemente de que comprendan un dominio Fc (por ejemplo, como se ensayó en todos los ensayos de función efectora conocidos en la técnica o se ejemplifica en el presente [por ejemplo, análisis ADCC]). A través de la unión cruzada entre células tumorales y células efectoras, el diacuerpo no solo acerca las células efectoras a las células tumorales, sino que conduce a la lisis efectiva del tumor (véase, por ejemplo, Cao et al.

(2003) "*Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics*," Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197).

Sin embargo, las ventajas anteriores conllevan un alto costo. La formación de tales diacuerpos no monoespecíficos requiere el ensamblado de dos o más polipéptidos distintos (es decir, tal formación requiere que los diacuerpos pueden se formen a través de la heterodimerización de diferentes tipos de cadenas polipeptídicas). A diferencia de los diacuerpos monoespecíficos, que se forman a través de la homodimerización de cadenas polipeptídicas idénticas. Debido a que se deben proveer al menos dos polipéptidos diferentes (es decir, dos tipos de polipéptidos) con el fin de formar un diacuerpo no monoespecífico, y a que la homodimerización de tales polipéptidos produce 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 forma tal de evitar la unión covalente entre polipéptidos del mismo tipo (Takemura, S. et al. (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*," Protein Eng. 13(8):583-588). Por lo tanto, la técnica ha desarrollado 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 Region*," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*," Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "*A Fully*

Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

Sin embargo, la técnica reconoce que diacuerpos monovalentes biespecíficos compuestos de polipéptidos asociados no covalentemente son inestables y se disocian fácilmente en monómeros no funcionales (véase, por ejemplo, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

De cara a este desafío, la técnica ha logrado desarrollar diacuerpos monoespecíficos heterodiméricos enlazados covalentemente estables (véase, por ejemplo, WO 2006/113665; WO/2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO/2012/162068; 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. Molec. Biol. 399(3):436-449; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; 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; US Patent Publications No. 2012/0294796 and 2013/0149236). Los métodos implican la ingeniería de uno o más residuos de cisteína en cada uno de los tipos de polipéptidos empleados. Por ejemplo, se ha demostrado que la adición de un residuo de cisteína al extremo C-terminal de tales constructos permite el enlace de

disulfuro entre las cadenas polipeptídicas, lo que estabiliza el heterodímero resultante sin interferir con las características de unión de la molécula bivalente.

Se describió que diacuerpos y otras inmunoglobulinas supuestamente tienen especificidad para gpA33 o CD3 o para ambos (véase, por ejemplo, US Patent Publications No. 2012/0014957; 2012/0034160; 2012/0087858; 2012/0189541; 2012/0195900; 2012/0201746; 2012/0237442; 2012/0263722; 2012/0258108; and 2012/0276608).

A pesar de este éxito, la producción de diacuerpos no mono-específicos heterodiméricos funcionales estables se puede mejorar aún más por la definición y colocación cuidadosa de los dominios empleados en las cadenas polipeptídicas. Por lo tanto, la presente invención se relaciona con la provisión de polipéptidos específicos, diseñados especialmente para formar, a través de enlace covalente, diacuerpos heterodiméricos y diacuerpos heterodiméricos Fc que pueden unirse simultáneamente a gpA33 y CD3.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se refiere a «diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3». En implementaciones específicas, los diacuerpos de la presente invención tienen además un dominio de una región Fc de inmunoglobulina (es decir, un «dominio Fc») («diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3») o un dominio de unión a albúmina («ABD») («diacuerpos monovalentes biespecíficos con ABD»), para extender la semivida *in vivo*. Los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención comprenden dos cadenas polipeptídicas diferentes que se asocian entre sí en forma heterodimérica para formar un sitio de unión específico a un epítipo de gpA33 y un sitio de unión

específico a un epítipo de CD3. Por lo tanto, los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención son monovalentes, en cuanto pueden unirse solo a una copia de epítipo de gpA33 y solo a una copia de epítipo de CD3, pero son biespecíficos, en cuanto un único diacuerpo puede unirse simultáneamente al epítipo de gpA33 y al epítipo de CD3.

Los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención se componen de dos cadenas polipeptídicas (una «primera» y una «segunda» cadena polipeptídica), enlazadas covalentemente entre sí, por ejemplo, por enlace de disulfuro de residuos de cisteína localizados dentro de cada cadena polipeptídica. Los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención se componen de tres cadenas polipeptídicas (una «primera», una «segunda» y una «tercera» cadena polipeptídica), con la primera y segunda cadenas polipeptídicas enlazadas covalentemente entre sí, y la primera y tercera cadenas polipeptídicas enlazadas covalentemente entre sí. Los diacuerpos monovalentes biespecíficos y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención pueden unirse simultáneamente a gpA33 y CD3. La invención se refiere a tales diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3, y a las composiciones farmacéuticas que contienen tales diacuerpos monovalentes biespecíficos o tales diacuerpos Fc monovalente biespecíficos. La invención se refiere además a los métodos para el uso de tales diacuerpos en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades y afecciones.

En detalle, la invención aporta un diacuerpo monovalente biespecífico, donde el diacuerpo monovalente

biespecífico puede unirse a un epítipo de gpA33 y a un epítipo de CD3, donde el diacuerpo monovalente biespecífico comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, donde la primera y la segunda cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí, y donde:

A. la primera cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende un subdominio (1A) que, a su vez, comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:5**); y un subdominio (1B) que, a su vez, comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (VH_{gpA33}) (**SEQ ID NO:27**); donde los subdominios (1A) y (1B) están separados uno del otro por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:1**);

ii. un dominio 2, donde el dominio 2 es un dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**) o un dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**), donde el dominio 2 está separado del dominio 1 por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:2**);

B. la segunda cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende un subdominio (1A) que, a su vez, comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (VL_{gpA33}) (**SEQ ID NO:26**); y un subdominio (1B) que, a su vez, comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:25**); donde los subdominios (1A) y (1B) están separados uno del otro por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:1**);

ii. un dominio 2, donde el dominio 2 es un dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**) o un dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**), donde el dominio 2 está separado del dominio 1 por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:2**); y donde el dominio 2 de la primera cadena polipeptídica y el dominio 2 de la segunda

cadena polipeptídica no son ambos dominios enrollados E ni son ambos dominios enrollados K;

y donde:

a) el dominio VL de la primera cadena polipeptídica y el dominio VH de la segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a un epítipo de CD3 específico; y

b) el dominio VH de la primera cadena polipeptídica y el dominio VL de la segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a un epítipo de gpA33 específico.

La invención se refiere, además, a la implementación del diacuerpo monovalente biespecífico descrito anteriormente, donde la primera cadena polipeptídica o la segunda cadena polipeptídica comprende un dominio de unión a albúmina (**SEQ ID NO:34**), ligado por el extremo C-terminal al dominio 2 o por el extremo N-terminal al dominio 1A a través de un ligador 3 (**SEQ ID NO:32**).

La invención también concierne un diacuerpo Fc monovalente biespecífico, donde el diacuerpo Fc monovalente biespecífico puede unirse a un epítipo de gpA33 específico y a un epítipo de CD3 específico, y posee un dominio Fc IgG, donde el diacuerpo Fc monovalente biespecífico comprende una primera cadena polipeptídica, una segunda cadena polipeptídica y una tercera cadena polipeptídica, donde la primera y la segunda cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí y la primera y la tercera cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí, y donde:

A. la primera cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende un subdominio (1A) que, a su vez, comprende un dominio VL de un anticuerpo

monoclonal capaz de unirse a gpA33 (VL_{gpA33}) (**SEQ ID NO:26**); y un subdominio (1B) que, a su vez, comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:25**); donde los subdominios (1A) y (1B) están separados uno del otro por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:1**);

ii. un dominio 2, donde el dominio 2 es un dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**) o un dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**), donde el dominio 2 está separado del dominio 1 por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:2**); y

iii. un dominio 3, que comprende un subdominio (3A) que, a su vez, comprende un péptido que contiene cisteína (péptido 1) (**SEQ ID NO:39**); y un subdominio (3B) que, a su vez, comprende una porción polipeptídica de un dominio Fc de IgG con los dominios CH2 y CH3 de un dominio Fc de IgG; donde los dominios 3 y 2 están separados uno del otro por un espaciador peptídico (ligador 5) (**GGG**);

B. la segunda cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende un subdominio (1A) que, a su vez, comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:5**), y un subdominio (1B) que, a su vez, comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (VH_{gpA33}) (**SEQ ID NO:27**); donde los subdominios (1A) y (1B) están separados uno del otro por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:1**);

ii. un dominio 2, donde el dominio 2 es un dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**) o un dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**), donde el dominio 2 está separado del dominio 1 por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:2**); y donde el dominio 2 de la primera cadena polipeptídica y el dominio 2 de la segunda cadena polipeptídica no son ambos dominios enrollados E ni son ambos dominios enrollados K; y

C. la tercera cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal, un dominio 3 que comprende:

(1) un subdominio (3A) que, a su vez, comprende un péptido que contiene cisteína (péptido 1) (**SEQ ID NO:39**); y

(2) un subdominio (3B) que, a su vez, comprende una porción polipeptídica de un dominio Fc de IgG con los dominios CH2 y CH3 de un dominio Fc de IgG;

y donde:

a) las porciones polipeptídicas de los dominios Fc de IgG de la primera y tercera cadenas polipeptídicas forman el dominio Fc de IgG;

b) el dominio VL de la primera cadena polipeptídica y el dominio VH de la segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a un epítipo de CD3 específico; y

c) el dominio VH de la primera cadena polipeptídica y el dominio VL de la segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a un epítipo de gpA33 específico.

La invención también concierne un diacuerpo Fc monovalente biespecífico, donde el diacuerpo Fc monovalente biespecífico puede unirse a un epítipo de gpA33 específico y a un epítipo de CD3 específico, y posee un dominio Fc IgG, donde el diacuerpo Fc monovalente biespecífico comprende una primera cadena polipeptídica, una segunda cadena polipeptídica y una tercera cadena polipeptídica, donde la primera y la segunda cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí y la primera y la tercera cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí, y donde:

A. la primera cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i. un dominio 3, que comprende un subdominio (3A) que, a su vez, comprende un péptido que contiene cisteína (péptido 1) (**SEQ ID NO:39**); y un subdominio (3B) que, a su vez, comprende una porción polipeptídica de un dominio Fc de IgG con los dominios CH2 y CH3 de un dominio Fc de IgG;

ii. un dominio 1, que comprende un subdominio (1A) que, a su vez, comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (VL_{gpA33}) (**SEQ ID NO:26**); y un subdominio (1B) que, a su vez, comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:25**); donde los subdominios (1A) y (1B) están separados uno del otro por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:1**);

donde los dominios 1 y 3 están separados uno del otro por un espaciador peptídico (ligador 4) (**SEQ ID NO:38**);

iii. un dominio 2, donde el dominio 2 es un dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**) o un dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**), donde el dominio 2 está separado del dominio 1 por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:2**); y

B. la segunda cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende un subdominio (1A) que, a su vez, comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:5**); y un subdominio (1B) que, a su vez, comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (VH_{gpA33}) (**SEQ ID NO:27**); donde los subdominios (1A) y (1B) están separados uno del otro por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:1**);

ii. un dominio 2, donde el dominio 2 es un dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**) o un dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**), donde el dominio 2 está separado del dominio 1 por un ligador peptídico (**SEQ ID NO:2**); y donde el dominio 2 de la primera cadena polipeptídica y el dominio 2 de la segunda

cadena polipeptídica no son ambos dominios enrollados E ni son ambos dominios enrollados K; y

C. la tercera cadena polipeptídica comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal, un dominio 3 que comprende:

(1) un subdominio (3A) que, a su vez, comprende un péptido que contiene cisteína (péptido 1) (**SEQ ID NO:39**); y

(2) un subdominio (3B) que, a su vez, comprende una porción polipeptídica de un dominio Fc de IgG con los dominios CH2 y CH3 de un dominio Fc de IgG;

y donde:

(a) las porciones polipeptídicas de los dominios Fc de IgG de la primera y tercera cadenas polipeptídicas forman el dominio Fc de IgG;

(b) el dominio VL de la primera cadena polipeptídica y el dominio VH de la segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a un epítipo de CD3 específico; y

(c) el dominio VH de la primera cadena polipeptídica y el dominio VL de la segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a un epítipo de gpA33 específico.

La invención se refiere además a las implementaciones de cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos descritos anteriormente, en el que el subdominio (3B) de la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia diferente de la del subdominio (3B) de la tercera cadena polipeptídica.

La invención se refiere además a las implementaciones de cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos descritos anteriormente, en el que el subdominio (3B) de la primera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:40** y el

subdominio (3B) de la tercera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:41**.

La invención se refiere además a las implementaciones de cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos descritos anteriormente, en el que el subdominio (3B) de la primera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:41** y el subdominio (3B) de la tercera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:40**.

La invención se refiere además a las implementaciones de cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos descritos anteriormente, en el que el dominio 3 de la primera cadena polipeptídica y/o el dominio 3 de la tercera cadena polipeptídica comprenden una variante de secuencia CH2-CH3, que exhibe una unión alterada a un receptor Fcγ.

La invención se refiere además a las implementaciones de cualquiera de los diacuerpos monovalentes biespecíficos descritos anteriormente o de cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos descritos anteriormente, en el que el dominio 2 de la primera cadena polipeptídica comprende un enrollado E (**SEQ ID NO:3**), y el dominio 2 de la segunda cadena polipeptídica comprende un enrollado K (**SEQ ID NO:4**).

La invención se refiere además a las implementaciones de cualquiera de los diacuerpos monovalentes biespecíficos descritos anteriormente o de cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos descritos anteriormente, en el que el dominio 2 de la primera cadena polipeptídica comprende un enrollado K (**SEQ ID NO:4**), y el dominio 2 de la segunda cadena polipeptídica comprende un enrollado E (**SEQ ID NO:3**).

La invención se refiere además a un diacuerpo monovalente biespecífico, donde el diacuerpo monovalente biespecífico puede unirse a un epítipo de CD3 y a un epítipo de gpA33, donde el diacuerpo monovalente biespecífico comprende:

(1) una primera cadena polipeptídica con la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:28**, y una segunda cadena polipeptídica con tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:30**; o

(2) una primera cadena polipeptídica con la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:35**, y una segunda cadena polipeptídica con tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:30**;

donde la primera y la segunda cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí por un enlace de disulfuro.

La invención se refiere además a un diacuerpo Fc monovalente biespecífico, donde el diacuerpo Fc monovalente biespecífico puede unirse a un epítipo de CD3 y a un epítipo de gpA33, y posee un dominio Fc de IgG, donde el diacuerpo Fc monovalente biespecífico comprende:

(1) una primera cadena polipeptídica con la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:42**, una segunda cadena polipeptídica con tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:44** y una tercera cadena polipeptídica con tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:46**; o

(2) una primera cadena polipeptídica con la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:48**, una segunda cadena polipeptídica con tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:28** y una tercera cadena polipeptídica con tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:46**;

donde la primera y la segunda cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí por un

primer enlace de disulfuro y la primera y la tercera cadenas polipeptídicas están enlazadas covalentemente entre sí por un segundo enlace de disulfuro.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los diacuerpos monovalentes biespecíficos descritos anteriormente o cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos descritos anteriormente; y a un vehículo fisiológicamente aceptable.

La invención se refiere además al uso de la composición farmacéutica descrita anteriormente en el tratamiento de un cáncer caracterizado por la expresión de gpA33 y, especialmente, tal uso donde el cáncer es un cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer gástrico o cáncer pancreático.

La invención se refiere además a una célula que expresa una cadena polipeptídica de cualquiera de los diacuerpos monovalentes biespecíficos descritos anteriormente o cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos descritos anteriormente, así como a un polinucleótido que codifica tal polipéptido expresado.

La invención se refiere además a una célula que expresa un anticuerpo o una porción o fragmento polipeptídico del mismo, donde el anticuerpo se une a gpA33, y donde el anticuerpo o la porción o fragmento polipeptídico del mismo comprende:

(1) CDR1 (**SEQ ID NO:14**), CDR2 (**SEQ ID NO:15**) y CDR3 (**SEQ ID NO:16**) de una cadena ligera de un anticuerpo anti-gpA33 humano;

(2) CDR1 (**SEQ ID NO:18**), CDR2 (**SEQ ID NO:19**) y CDR3 (**SEQ ID NO:20**) de una cadena pesada de un anticuerpo anti-gpA33 humano; o

(3) ambos, (1) y (2).

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** ilustra las estructuras de la primera y segunda cadenas polipeptídicas de un diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 de dos cadenas, de la presente invención.

Las **Figuras 2A y 2B** ilustran las estructuras de dos versiones de la primera, segunda y tercera cadenas polipeptídicas de un diacuerpo Fc monovalente biespecífico gpA33 x CD3 de tres cadenas, de la presente invención (versión 1, **Figura 2A**; y versión 2, **Figura 2B**).

La **Figura 3** demuestra que los diacuerpos de la presente invención pueden unirse simultáneamente a CD3 y a gpA33.

La **Figura 4** ilustra la capacidad de los diacuerpos de la presente invención para tratar el cáncer. Se incubaron células de cáncer colorrectal o cáncer pancreático en presencia del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (DART-1) y PBMC humanas (E:B = 25:1) o bien células T humanas activadas (E:B = 10:1), y se midió la citotoxicidad (**Figura 4A** (células colorrectales C562 de colon), **Figura 4B** (células colorrectales Colo205), y **Figura 4C** (células de cáncer pancreático ASPC-1)).

Las **Figuras 5A-5F** muestran que se produjo la activación de las células T CD8 en presencia del diacuerpo monovalente biespecífico CD3 (DART-1) solo en presencia de células cancerígenas (**Figuras 5A-5C**: células T CD8 + células colo205 (**Figura 5A**), células T CD8 + células ASPC-1 (**Figura 5B**), células T CD8 solas (**Figura 5C**); **Figuras 5D-5F**: células T CD4 + células colo205 (**Figura 5D**), células T CD4 + células ASPC-1 (**Figura 5E**), células T CD8 solas (**Figura 5F**)).

Las **Figuras 6A-6D** demuestran que los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 (DART-1 y DART-2) mediaron la citotoxicidad equivalente para células de

adenocarcinoma colorrectal SW948 (**Figura 6A**) y células colo205 (**Figura 6B**) y células Colo205-Luc (**Figura 6C**), y que ningún diacuerpo medió la citotoxicidad de la línea celular de gpA33 negativa, HCT116 (**Figura 6D**).

Las **Figuras 7A-7D** demuestran la capacidad del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (DART-2), el diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio de unión a albúmina (DART-2 con ABD «c/ABD») y el diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio Fc de IgG (DART-2 con Fc «c/Fc») para promover la citotoxicidad de las células cancerosas en presencia de PBMC humanas o de mono cynomolgus.

La **Figura 8** demuestra la capacidad *in vivo* del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (DART-1) para disminuir el volumen del tumor en un modelo murino de cáncer de colon Colo205.

Las **Figuras 9A-9D** muestran datos de imágenes de tumores de ratones NOD scid gamma (NDG) implantados con células Colo205 dos días después de recibir el vehículo (**Figura 9A**) o el diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (DART-1) (**Figura 9B**), y 12 días después de recibir el vehículo (**Figura 9C**) o el DART-1 (**Figura 9D**).

La **Figura 10** demuestra la capacidad *in vivo* del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (DART-1) para disminuir el volumen del tumor en un modelo murino de cáncer pancreático ASPC-1.

La **Figura 11** muestra la capacidad del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio Fc de inmunoglobulina IgG (DART-2 c/Fc Versión 1) para mediar una drástica reducción en el volumen del tumor en un modelo *in vivo* de cáncer de colon.

La **Figura 12** muestra la capacidad del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio Fc

de inmunoglobulina IgG (DART-2 c/Fc Versión 1) para mediar una reducción en el volumen del tumor en un modelo *in vivo* de cáncer de colon, incluso a dosis extremadamente bajas.

La **Figura 13** muestra la farmacocinética del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (DART-2) y del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio Fc de inmunoglobulina IgG (DART-2 c/Fc Versión 1) en monos cynomolgus.

Las **Figuras 14A-14B** muestran el análisis SPR de la unión de DART-2 c/Fc Versión 1 a CD3 inmovilizado humano y de mono cynomolgus. Las líneas discontinuas negras representan el ajuste global a un modelo 1:1 de Langmuir de curvas de unión obtenidas a concentraciones de ART-2 c/Fc de 0, 6,25, 12,5, 25, 50 o 100 nM. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Las **Figuras 15A-15B** muestran el análisis SPR de la unión de DART-2 c/Fc Versión 1 a gpA33 capturado humano y de mono cynomolgus. Las líneas discontinuas negras representan el ajuste global a un modelo 1:1 de Langmuir de curvas de unión obtenidas a concentraciones de ART-2 c/Fc versión 1 de 0, 6,25, 12,5, 25, 50 o 100 nM. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Descripción detallada de la invención:

La presente invención se refiere a diacuerpos monovalentes biespecíficos que comprenden dos cadenas polipeptídicas y poseen un sitio de unión específico a un epítipo de gpA33 y un sitio de unión específico a un epítipo de CD3 (es decir, un «diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3»). La presente invención se refiere además a diacuerpos monovalentes biespecíficos que comprenden un dominio Fc de inmunoglobulina («diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos»), están compuestos de tres cadenas polipeptídicas y poseen al menos un sitio de unión específico

a un epítopo de gpA33 y un sitio de unión específico a un epítopo de CD3 (es decir, un «diacuerpo Fc monovalente biespecífico gpA33 x CD3»). Los diacuerpos monovalentes biespecíficos y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención pueden unirse simultáneamente a gpA33 y CD3. La invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen tales diacuerpos monovalentes biespecíficos o tales diacuerpos Fc monovalente biespecíficos. La invención se refiere además a los métodos para el uso de tales diacuerpos en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades y afecciones.

Los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención están compuestos por dos cadenas polipeptídicas que se asocian entre sí para formar un sitio de unión específico a un epítopo de gpA33 y un sitio de unión específico a un epítopo de CD3. Las cadenas polipeptídicas individuales del diacuerpo se enlazan covalentemente entre sí, por ejemplo, por enlace de disulfuro de residuos de cisteína localizados dentro de cada cadena polipeptídica. Cada cadena polipeptídica contiene un dominio de unión a antígeno de un dominio variable de cadena ligera, un dominio de unión a antígeno de un dominio variable de cadena pesada y un dominio de heterodimerización. Un ligador peptídico interviniente (ligador 1) hace la separación entre el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena ligera y el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada. El dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena ligera de la primera cadena polipeptídica interactúa con el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada de la segunda cadena polipeptídica, para formar un primer sitio funcional de unión a antígeno para el primer antígeno (es decir, gpA33 o CD3). Asimismo, el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena

ligera de la segunda cadena polipeptídica interactúa con el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada de la primera cadena polipeptídica, para formar un segundo sitio funcional de unión a antígeno para el segundo antígeno (es decir, gpA33 o CD3, dependiendo de la identidad del primer antígeno). Por lo tanto, se coordina la selección del dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena ligera y el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada de la primera y segunda cadenas polipeptídicas, de modo tal que las dos cadenas polipeptídicas conjuntamente comprendan dominios de unión a antígeno de dominios variables de cadena ligera y pesada capaces de unirse a gpA33 y CD3.

Los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención se componen de una primera cadena polipeptídica, una segunda cadena polipeptídica y una tercera cadena polipeptídica. La primera y la segunda cadenas polipeptídicas se asocian entre sí para formar un sitio de unión específico a un epítipo de gpA33 y un sitio de unión específico a un epítipo de CD3. La primera cadena polipeptídica y la tercera cadena polipeptídica se asocian entre sí para formar un dominio Fc de inmunoglobulina. La primera y la tercera cadenas polipeptídicas del diacuerpo Fc monovalente biespecífico se enlazan covalentemente entre sí, por ejemplo, por enlace de disulfuro de residuos de cisteína localizados dentro de cada cadena polipeptídica. La primera y la segunda cadenas polipeptídicas del diacuerpo Fc monovalente biespecífico se enlazan covalentemente entre sí, por ejemplo, por enlace de disulfuro de residuos de cisteína localizados dentro de cada cadena polipeptídica. La primera y la segunda cadenas polipeptídicas contienen un dominio de unión a antígeno de un dominio variable de cadena ligera, un dominio de unión a antígeno de un dominio variable de cadena

pesada y un dominio de heterodimerización. Un ligador peptídico interviniente (ligador 1) hace la separación entre el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena ligera y el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada. El dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena ligera de la primera cadena polipeptídica interactúa con el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada de la segunda cadena polipeptídica, para formar un primer sitio funcional de unión a antígeno para el primer antígeno (es decir, gpA33 o CD3). Asimismo, el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena ligera de la segunda cadena polipeptídica interactúa con el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada de la primera cadena polipeptídica, para formar un segundo sitio funcional de unión a antígeno para el segundo antígeno (es decir, gpA33 o CD3, dependiendo de la identidad del primer antígeno). Por lo tanto, se coordina la selección del dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena ligera y el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada de la primera y segunda cadenas polipeptídicas, de modo tal que las dos cadenas polipeptídicas conjuntamente comprendan dominios de unión a antígeno de dominios variables de cadena ligera y pesada capaces de unirse a gpA33 y CD3. La primera y la tercera cadenas polipeptídicas contienen, cada una, un péptido que contiene cisteína (péptido 1) **SEQ ID NO:39:** y parte o la totalidad del dominio CH2 y/o parte o la totalidad del dominio CH3 de un dominio completo FC de inmunoglobulina y un péptido que contiene cisteína. La parte o la totalidad del dominio CH2 y/o la parte o la totalidad del dominio CH3 se asocian para formar el dominio FC de inmunoglobulina de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención. La primera y la tercera cadenas polipeptídicas de

los diacuerpos Fc monovalente biespecífico de la presente invención se enlazan covalentemente entre sí, por ejemplo, por enlace de disulfuro de residuos de cisteína localizados dentro del péptido que contiene cisteína de las cadenas polipeptídicas.

La formación de heterodímeros de la primera y la segunda cadenas polipeptídicas del diacuerpo monovalente biespecífico o diacuerpo Fc monovalente biespecífico puede ser impulsada por los dominios de heterodimerización. Tales dominios incluyen GVEPKSC (**SEQ ID NO:54**) (o VEPKSC; **SEQ ID NO:55**) en una cadena polipeptídica yGFNRGEC (**SEQ ID NO:56**) (o FNRGEC; **SEQ ID NO:57**) en la otra cadena polipeptídica (US2007/0004909). Alternativamente, tales dominios se pueden diseñar para contener enrollados de cargas opuestas. El dominio de heterodimerización de una de las cadenas polipeptídicas comprende una secuencia de al menos seis, al menos siete o al menos ocho aminoácidos cargados positivamente, y el dominio de heterodimerización de la otra cadena polipeptídica comprende una secuencia de al menos seis, al menos siete o al menos ocho aminoácidos cargados negativamente. Por ejemplo, el primero o el segundo dominio de heterodimerización puede comprender una secuencia con ocho aminoácidos cargados positivamente y el otro de los dominios de heterodimerización puede comprender una secuencia con ocho aminoácidos cargados negativamente. El aminoácido cargado positivamente puede ser lisina, arginina, histidina, etc. y/o el aminoácido cargado negativamente puede ser ácido glutámico, ácido aspártico, etc. El aminoácido cargado es, de preferencia, lisina y/o el aminoácido cargado negativamente es, de preferencia, ser ácido glutámico.

Los diacuerpos monovalentes biespecíficos y diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención son diseñados de modo que tales primera y segunda

cadena polipeptídica se enlazan covalentemente entre sí a través de residuos de cisteína a todo lo largo. Tales residuos de cisteína se pueden introducir en el ligador interviniente que separa los dominios VL y VH de los polipéptidos. Alternativamente, y más preferiblemente, se introduce un segundo péptido (ligador 2) en cada cadena polipeptídica, por ejemplo, en el extremo amino-terminal de las cadenas polipeptídicas o en una posición que coloca el ligador 2 entre el dominio de heterodimerización y el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena ligera o del dominio variable de cadena pesada.

Como se indicó anteriormente, gpA33 es expresada por las células colorrectales. Los anticuerpos capaces de unirse inmuno-específicamente a gpA33 son capaces de unirse a dichas células. CD3 se expresa en las células T. Por lo tanto, los anticuerpos capaces de unirse inmuno-específicamente a ambos gpA33 y CD3 son capaces de apuntar las células T a células colorrectales y otras células cancerosas que expresan gpA33 (por ejemplo, células de carcinoma de colon, células de cáncer pancreático, etc.) y, por consiguiente, proporcionar una terapia mejorada para tales tipos de cáncer.

DIACUERPOS MONOVALENTES BIESPECÍFICOS GPA33 X CD3
PREFERIDOS DE LA PRESENTE INVENCION

A. DIACUERPOS MONOVALENTES BIESPECÍFICOS GPA33 X CD3

Una implementación de la presente invención se relaciona con diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 que se componen de una primera cadena polipeptídica, una segunda cadena polipeptídica y una tercera cadena polipeptídica, cuyas secuencias permiten que las cadenas polipeptídicas se enlacen covalentemente entre sí para formar

un complejo covalentemente asociado que es capaz de unirse simultáneamente a gpA33 y CD3.

La primera cadena polipeptídica de los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 preferidos comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal, un N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 o bien a gpA33 (es decir, ya sea VL_{CD3} o VL_{gpA33}), un primer péptido espaciador interviniente (ligador 1), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (si la primera cadena polipeptídica contiene VL_{CD3}) o CD3 (si la primera cadena polipeptídica contiene VL_{gpA33}), un segundo péptido espaciador interviniente que contiene cisteína (ligador 2), un dominio promotor de heterodímeros y un C-terminal (**Figura 1**).

La segunda cadena polipeptídica de los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 preferidos comprende, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal, un N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 o bien a CD3 (es decir, ya sea VL_{gpA33} o VL_{CD3}, dependiendo del dominio VL seleccionado para la primera cadena polipeptídica del diacuerpo), un péptido ligador interviniente (ligador 1), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (si la segunda cadena polipeptídica contiene VL_{gpA33}) o gpA33 (si la segunda cadena polipeptídica contiene VL_{CD3}), un péptido espaciador interviniente que contiene cisteína (ligador 2), un dominio promotor de heterodímeros y un C-terminal (**Figura 1**).

El dominio VL de la primera cadena polipeptídica de los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 preferidos interactúa con el dominio VH de la segunda cadena polipeptídica los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 preferidos, para formar un primer sitio funcional de unión a antígeno para el primer antígeno (es decir, CD3 o

gpA33). Asimismo, el dominio VL de la segunda cadena polipeptídica interactúa con el dominio VH de la primera cadena polipeptídica, para formar un segundo sitio funcional de unión a antígeno para un segundo antígeno (es decir, gpA33 o CD3, dependiendo de la identidad del primer antígeno). Por lo tanto, se coordina la selección de los dominios VL y VH de la primera y la segunda cadenas polipeptídicas, de modo tal que las dos cadenas polipeptídicas de los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 preferidos, conjuntamente, comprendan dominios VL y VH capaces de unirse a gpA33 y CD3 (es decir, que comprenden VL_{CD3}/VH_{CD3} y VL_{gpA33}/VH_{gpA33}).

Más preferiblemente aún, se selecciona la longitud del péptido ligador interviniente (ligador 1, que separa dichos dominios VL y VH) para evitar sustancial o completamente que los dominios VL y VH de la cadena polipeptídica se unan uno al otro. Por lo tanto, los dominios VL y VH de la primera cadena polipeptídica son sustancial o completamente incapaces de unirse entre sí. Asimismo, los dominios VL y VH de la segunda cadena polipeptídica son sustancial o completamente incapaces de unirse entre sí. Un péptido espaciador interviniente preferido (ligador 1) tiene la secuencia (**SEQ ID NO:1**): GGGSGGGG.

El segundo péptido espaciador interviniente que contiene cisteína (ligador 2) contendrá 1, 2, 3 o más cisteínas. Un péptido espaciador interviniente que contiene cisteína preferido (ligador 2) tiene la secuencia (**SEQ ID NO:2**): GGCGGG.

Los dominios promotores de heterodímeros de la primera y la segunda cadenas polipeptídicas son diferentes entre sí y están diseñadas para asociarse entre sí de modo de promover la asociación de la primera y la segunda cadenas polipeptídicas. Por lo tanto, en una implementación

preferida, una de esas cadenas polipeptídicas se diseñará para contener un dominio enrollado E promotor de heterodímeros (**SEQ ID NO:3**):

EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

cuyos residuos formarán una carga negativa a pH 7, mientras la otra de las dos cadenas polipeptídicas se diseñará para contener un dominio enrollado K promotor de heterodímeros (**SEQ ID NO:4**):

KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

cuyos residuos formarán una carga positiva a pH 7. La presencia de tales dominios cargados promueve la asociación entre el primero y el segundo polipéptidos, y por lo tanto fomenta la heterodimerización. Es indiferente cual enrollado se asigna a cada cadena, siempre que los enrollados empleados en la primera y la segunda cadenas polipeptídicas sean diferentes, a fin de fomentar la heterodimerización entre las cadenas.

EL DIACUERPO MONOVALENTE BIESPECÍFICO GPA33 X CD3, «DART-1»

La primera y la segunda cadenas polipeptídicas de un diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 preferido, designado en lo sucesivo «DART-1», comprende dominios polipeptídicos que tienen las siguientes secuencias:

El dominio VL de un anticuerpo que se une a CD3 (**VL_{CD3}**) (**SEQ ID NO:5**):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIG
GTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG

El dominio de unión a antígeno de VL_{CD3} comprende CDR1 que tiene la secuencia: (**SEQ ID NO:6**) RSSTGAVTTSNYAN; CDR2 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:7**): GTNKRAP; y CDR3 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:8**): ALWYSNLWV.

El dominio VH de un anticuerpo que se une a CD3 (**VH_{CD3}**) (**SEQ ID NO:9**):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI
RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWF
AYWGQGTLLVTVSS

El dominio de unión a antígeno de VH_{CD3} comprende:
CDR1 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:10**): TYAMN; CDR2 que
tiene la secuencia (**SEQ ID NO:11**): RIRSKYNNYATYYADSVKD; y
CDR3 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:12**): HGNFGNSYVSWFAY.

El dominio VL de un anticuerpo murino que se une a
gpA33 (**VL_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:13**):

QIVLTQSPAISASPGERVMTCSARSSISFMYWYQQKPGSSPRLLIYDTS
NLASGVPVRFSGSGSGTSYSLSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGSGTKLELK

El dominio de unión a antígeno de VL_{gpA33} comprende
CDR1 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:14**): SARSSISFMY; CDR2
que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:15**): DTSNLAS; y CDR3 que
tiene la secuencia (**SEQ ID NO:16**): QQWSSYPLT.

El dominio VH de un anticuerpo murino que se une a
gpA33 (**VH_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:17**):

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFSGSWMNWVKQRPQGQGLEWIGRI
YPGDGETNYNGKFKDKATLTADKSSTTAYMELSSLTSDSAVYFCARIYGNNVYFDVWGAG
TTVTVSS

El dominio de unión a antígeno de VH_{gpA33} comprende
CDR1 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:18**): GSWMN; CDR2 que
tiene la secuencia (**SEQ ID NO:19**): RIYPGDGETNYNGKFKD; y CDR3
que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:20**): IYGNNVYFDV.

El primer péptido espaciador interviniente
preferido (ligador 1) tiene la secuencia (**SEQ ID NO:1**):
GGGSGGGG. El péptido espaciador interviniente que contiene
cisteína preferido (ligador 2) tiene la secuencia (**SEQ ID
NO:2**): GGC GGG.

El dominio promotor de heterodímeros de la primera
cadena polipeptídica es el dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**).
El dominio promotor de heterodímeros de la segunda cadena
polipeptídica es el dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**).

Por lo tanto, la primera cadena polipeptídica de DART-1 tiene la secuencia (**SEQ ID NO:21**):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIG
GTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFSGSWMNWVKQRPQGQLEWIGRIYPGD
GETNYNGKFKDKATLTADKSSTTAYMELSSLTSVDSAVYFCARIYGNNVYFDVWGAGTTVT
VSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

Como se apreciará, los residuos 1-110 de **SEQ ID NO:21** son el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD3 (**VL_{CD3}**) (**SEQ ID NO:5**); los residuos 111-118 de **SEQ ID NO:21** son el primer péptido espaciador interviniente (ligador 1) (**SEQ ID NO:1**); los residuos 119-237 de **SEQ ID NO:21** son el dominio VH de un anticuerpo murino que se une a gpA33 (**VH_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:17**), los residuos 238-243 de **SEQ ID NO:21** son un péptido espaciador que contiene cisteína (ligador 2) (**SEQ ID NO:2**) y los residuos 244-271 de **SEQ ID NO:21** son el dominio enrollado E promotor de heterodímeros (**SEQ ID NO:3**).

Un polinucleótido preferido que codifica la primera cadena polipeptídica de DART-1 tiene la secuencia (**SEQ ID NO:22**):

caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcggaact
gtgaccctgacatgcagatccagcacaggcgagtgaccacatctaactacgccaattggg
tgcagcagaagccaggacaggcaccaaggggcctgatcggggtacaaacaaaagggtcc
ctggaccctgcacggttttctggaagtctgctgggcggaaggccgctctgactattacc
ggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtggg
tgttcgggggtggcacaaaactgactgtgctgggaggtggtggatccggcgaggtggaca
ggtccagctgcagcagtctggacctgagctggtgaagcctggggcctcagtgaagatttcc
tgcaaagcttcaggctacacattcagtggctcttgatgaactgggtgaagcagaggcctg
gacagggtcttgagtggattggacggatctaccctggagatggagaaactaactacaatgg
gaagtttaaggacaaggccacactgactgcagacaaatcatccaccacagcctacatggag
ctcagcagcctgacctctgtggactctgcggtctatcttctgtgcaagaatctatggtaata
acgtttacttcgatgtctggggcgcagggaccacggtcaccgtgtcttccggaggatgtgg

cggtggagaagtggccgcactggagaaagaggttgctgctttggagaaggaggtcgctgca
cttgaagaggaggtcgagccctggagaaa

La segunda cadena polipeptídica de DART-1 tiene la secuencia (**SEQ ID NO:23**):

QIVLTQSPAIMASASPGERVMTCSARSSISFMYWYQQKPGSSPRLLIYDTS
NLASGVPVRFSGSGSGTSYSLSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGSGTKLELKRGGGSG
GGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY
ATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT
LVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Como se apreciará, los residuos 1- 107 de **SEQ ID NO:23** son el dominio VL de un anticuerpo que se une a gpA33 (**VL_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:13**); los residuos 108-115 de **SEQ ID NO:23** son el primer péptido espaciador interviniente (ligador 1) (**SEQ ID NO:1**); los residuos 116-240 de **SEQ ID NO:23** son el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD3 (**VH_{CD3}**) (**SEQ ID NO:9**), los residuos 241-246 de **SEQ ID NO:23** son un péptido espaciador que contiene cisteína (ligador 2) (**SEQ ID NO:2**) y los residuos 247-274 de **SEQ ID NO:23** son el dominio enrollado K promotor de heterodímeros (**SEQ ID NO:4**).

Un polinucleótido preferido que codifica la segunda cadena polipeptídica de DART-1 tiene la secuencia (**SEQ ID NO:24**):

caaattgttctcaccagtcctccagcaatcatgtctgcatctccaggggag
agggtcaccatgacctgcagtgccagggtcaagtataagtttcatgtactggtaccagcaga
agccaggatcctccccagactcctgatttatgacacatccaacctggcttctggagtccc
tgttcgcttcagtggcagtgggtctgggacctcttattctctcacaatcagccgaatggag
gctgaagatgctgccacttattactgccagcagtggagtagttaccactcacgttcggtt
ctgggaccaagctggagctgaaacgggggtggaggatccggcggaggcgagaggtgcagct
ggtggagtctgggggaggcttggtccagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcc
tctggattcaccttcaacacatacgctatgaattgggtccgccagggtccagggaaggggc
tgagtggttgcaaggatcagggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactc
tgtgaaggatagattcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaag
aacagcctgaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggca

attcttacgtgtccttggtttgcttattggggacaggggacactggtgactgtgtccttccgg
aggatgtggcggtggaaaagtggccgcactgaaggagaaagttgctgctttgaaagagaag
gtcgccgcacttaaggaaaaggtcgcagccctgaaagag

EL DIACUERPO MONOVALENTE BIESPECÍFICO GPA33 X CD3,
«DART-2»

La primera y la segunda cadenas polipeptídicas de un segundo diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 preferido, designado en lo sucesivo «DART-2», comprende dominios polipeptídicos que tienen las siguientes secuencias:

El dominio VL de un anticuerpo que se une a CD3 (**VL_{CD3}**) (**SEQ ID NO:5**):

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIG
GTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG

El dominio de unión a antígeno de VL_{CD3} comprende CDR1 que tiene la secuencia: (**SEQ ID NO:6**) RSSTGAVTTSNYAN; CDR2 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:7**): GTNKRAP; y CDR3 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:8**): ALWYSNLWV

El dominio VH de un anticuerpo que se une a CD3 (**VH_{CD3}**) (**SEQ ID NO:25**):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRI
RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWF
AYWGQGTLLVTVSS

El dominio de unión a antígeno de VH_{CD3} comprende CDR1 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:10**): TYAMN; CDR2 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:11**): RIRSKYNNYATYYADSVKD; y CDR3 que tiene la secuencia: (**SEQ ID NO:12**) HGNFGNSYVSWFAY.

El anticuerpo murino que se une a gpA33 humano, discutido anteriormente, fue humanizado para proporcionar los dominios VL y VH del diacuerpo preferido DART-2. Estos dominios humanizados son los siguientes:

El dominio VL de un anticuerpo humanizado que se une a gpA33 (**VL_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:26**):

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTTITCSARSSISFMYWYQQKPGKAPKLLIYDTS
NLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIK

El dominio de unión a antígeno de VL_{gpA33} comprende CDR1 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:14**): SARSSISFMY; CDR2 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:15**): DTSNLAS; y CDR3 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:16**): QQWSSYPLT.

El dominio VH de un anticuerpo humanizado que se une a gpA33 (**VH_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:27**):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGSWMNWVRQAPGQGLEWIGRI
YPGDGETNYNGKFKDRVTTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARIYGNNVYFDVWGQG
TTVTVSS

El dominio de unión a antígeno de VH_{gpA33} comprende CDR1 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:18**): GSWMN; CDR2 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:19**): RIYPGDGETNYNGKFKD; y CDR3 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:20**): IYGNNVYFDV.

El primer péptido espaciador interviniente preferido (ligador 1) tiene la secuencia (**SEQ ID NO:1**): GGGSGGGG. El péptido espaciador interviniente que contiene cisteína preferido (ligador 2) tiene la secuencia (**SEQ ID NO:2**): GGCGGG.

El dominio promotor de heterodímeros de la primera cadena polipeptídica es el dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**). El dominio promotor de heterodímeros de la segunda cadena polipeptídica es el dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**).

Por lo tanto, la primera cadena polipeptídica de DART-2 tiene la secuencia (**SEQ ID NO:28**):

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIG
GTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGSWMNWVRQAPGQGLEWIGRIYPGD
GETNYNGKFKDRVTTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARIYGNNVYFDVWGQGTTVT
VSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

Como se apreciará, los residuos 1-110 de **SEQ ID NO:28** son el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD3

(VL_{CD3}) (SEQ ID NO:5); los residuos 111-118 de SEQ ID NO:28 son el primer péptido espaciador interviniente (ligador 1) (SEQ ID NO:1); los residuos 119-237 de SEQ ID NO:28 son el dominio VH de un anticuerpo que se une a gpA33 (VH_{gpA33}) (SEQ ID NO:27), los residuos 238-243 de SEQ ID NO:28 son un péptido espaciador que contiene cisteína (ligador 2) (SEQ ID NO:2) y los residuos 244-271 de SEQ ID NO:28 son el dominio enrollado E promotor de heterodímeros (SEQ ID NO:3).

Un polinucleótido preferido que codifica la primera cadena polipeptídica de DART-2 tiene la secuencia (SEQ ID NO:29):

```
caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcggaact
gtgaccctgacatgcagatccagcacaggcgagtgaccacatctaactacgccaattggg
tgcagcagaagccaggacaggcaccaaggggcctgatcgggggtacaaacaaaagggtcc
ctggacccctgcacggttttctggaagtctgctgggcggaaaggccgctctgactattacc
ggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtggg
tgttcgggggtggcacaaaactgactgtgctgggaggtggtggatccggcgaggtggaca
ggtccagctggtccagagcggggcccgaagtcaaaaaacccggagcaagcgtgaaggtctcc
tgcaaagcatcaggctatacatttacaggcagctggatgaactgggtgaggcaggctccag
gacagggactggagtggatcgggcgcatctaccctggagacggcgaaactaactataatgg
aaagttcaaagaccgagtgaccatcacagccgataagtctactagtaccgcctacatggag
ctgagctccctgcggtctgaagataccgccgtctactattgcgctagaatttacggaaaca
atgtctattttgacgtgtgggggcagggaacaactgtgactgtctcctccggaggatgtgg
cgggtggagaagtggccgcactggagaaagaggttgctgctttggagaaggaggtcgctgca
cttgaaaaggaggtcgagccctggagaaa
```

La segunda cadena polipeptídica de DART-2 tiene la secuencia (SEQ ID NO:30):

```
DIQLTQSPSFLSASVGDRVTTITCSARSSISFMYWYQQKPGKAPKLLIYDTS
NLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLSLEAEDAATYYCQWSSYPLTFGQGTKLEIKGGGSGG
GGEVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYA
TYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNGNSYVSWFAYWGQGLT
VTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
```

Como se apreciará, los residuos 1- 106 de **SEQ ID NO:30** son el dominio VL de un anticuerpo que se une a gpA33 (**VL_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:26**); los residuos 107-114 de **SEQ ID NO:30** son el primer péptido espaciador interviniente (ligador 1) (**SEQ ID NO:1**); los residuos 115-239 de **SEQ ID NO:30** son el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD3 (**VH_{CD3}**) (**SEQ ID NO:25**), los residuos 240-245 de **SEQ ID NO:30** son un péptido espaciador que contiene cisteína (ligador 2) (**SEQ ID NO:2**) y los residuos 246-273 de **SEQ ID NO:30** son el dominio enrollado K promotor de heterodímeros (**SEQ ID NO:4**).

Un polinucleótido preferido que codifica la segunda cadena polipeptídica de DART-2 tiene la secuencia (**SEQ ID NO:31**):

```
gacattcagctgactcagtcctccctcttttctgtccgcatccgtcggagat
cgagtgactattacttgctctgctaggtcctcaatcagcttcatgtactggtatcagcaga
agcccggcaaagcacctaagctgctgatctacgacacaagcaacctggcctccgggggtgcc
atctcggttctctggtcagtggtcaggaactgagtttaccctgacaattagctccctggag
gctgaagatgccgctacctactattgccagcagtgaggcagctatcctctgaccttcggac
aggggactaaactggaaatcaaggggtggaggatccggcggcggaggcgaggtgcagctggt
ggagtctgggggagggttggtccagcctggaggggtccctgagactctcctgtgcagcctct
ggattcaccttcagcacatacgctatgaattgggtccgccagggtccagggaaggggctgg
agtgggttggaaggatcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgt
gaaggatagattcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaataaac
agcctgaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaatt
cttacgtgtcttggtttgcttattggggacaggggacactggtgactgtgtcttccggagg
atgtggcgggtggaaaagtggccgcactgaaggagaaagttgctgctttgaaagagaaggtc
gccgcacttaaggaaaagggtcgcagccctgaaagag
```

EL DIACUERPO MONOVALENTE BIESPECÍFICO GPA33 X CD3 QUE TIENE UN DOMINIO DE UNIÓN A ALBÚMINA (ABD) («DART-2 C/ABD»)

En otra implementación de la invención, el diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 comprenderá un

dominio de unión a albúmina («ABD») («diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 con ABD»)

Como se describe en el documento WO 2012/018687, con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de moléculas de diacuerpos, las moléculas pueden ser modificadas para contener una porción polipeptídica de una proteína de unión sérica en uno o más de los extremos de la molécula de diacuerpo. Preferiblemente, dicha porción polipeptídica de una proteína de unión sérica se instalará en el extremo C-terminal de la molécula de diacuerpo. Una porción polipeptídica de una proteína de unión sérica particularmente preferida para este fin es el dominio de unión a albúmina (ABD) de la proteína estreptocócica G. Se prefiere particularmente el dominio de unión a albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa G148 de *Streptococcus*.

El dominio de unión a albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa G148 de *Streptococcus* consta de 46 residuos de aminoácidos que forman un haz de tres hélice estable 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 el plasma y tiene una semivida de 19 días en humanos. La albúmina posee varios pequeños sitios de unión moleculares que permiten que se una de forma no covalente a otras proteínas, de modo que se extiende su semivida en suero.

Por lo tanto, la primera cadena polipeptídica o la segunda cadena polipeptídica de un diacuerpo biespecífico monovalente gpA33 x CD3 que tiene un dominio de unión a albúmina, contiene un tercer ligador (ligador 3), que separa el enrollado E (o enrollado K) de dicha cadena polipeptídica del dominio de unión a albúmina. Una secuencia preferida para

ese ligador 3 es GGGS (**SEQ ID NO:32**) o GGGNS (**SEQ ID NO:33**). Un dominio de unión a albúmina (**ABD**) preferido tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:34**):

LAQAKEAAIRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP

Con el fin de ilustrar este aspecto de la invención, se modificó la primera cadena polipeptídica del DART-2 descrito anteriormente para contener un dominio de unión a albúmina, lo que dio lugar a un diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un ABD, designado en el presente «DART-2 c/ABD».

La primera cadena polipeptídica de tal DART-2 c/ABD tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:35**):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIG
GTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGSMNWVRQAPGQGLEWIGRIYPGD
GETNYNGKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNNVYFDVWGQGT
VSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGSLAQAKEAAIRELDKYGVSDY
YKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP

Como se apreciará, los residuos 1-271 de **SEQ ID NO:35** son idénticos a los residuos de DART-2 y, por lo tanto, proporcionan, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal, el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD3 (**VL_{CD3}**) (**SEQ ID NO:5**); el primer péptido espaciador interviniente (ligador 1) (**SEQ ID NO:1**); el dominio VH de un anticuerpo que se une a gpA33 (**VH_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:27**), el péptido espaciador que contiene cisteína (ligador 2) (**SEQ ID NO:2**) y el dominio enrollado E promotor de heterodímeros (**SEQ ID NO:3**) y un extremo C-terminal. Los residuos 272-275 son el ligador 3 (**SEQ ID NO:32**) y los residuos 276-321 son un dominio de unión a albúmina (**SEQ ID NO:34**).

Un polinucleótido preferido que codifica la primera cadena polipeptídica de DART-2 c/ABD tiene la secuencia (**SEQ ID NO:36**):

caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcggaact
 gtgaccctgacatgcagatccagcacaggcgagtgaccacatctaactacgccaattggg
 tgcagcagaagccaggacaggcaccaaggggctgatcggggtacaaacaaaagggtcc
 ctggacccctgcacgggttttctggaagtctgctgggcggaaaggccgctctgactattacc
 ggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtggg
 tgttcgggggtggcacaaaactgactgtgctgggaggggggtggatccggcggaggtggaca
 ggtccagctggtccagagcggggccgaagtcaaaaaacccggagcaagcgtgaaggtctcc
 tgcaaagcatcaggctatacatttacaggcagctggatgaactgggtgaggcaggctccag
 gacagggactggagtggatcgggcgcacatctaccctggagacggcgaaactaactataatgg
 aaagttcaaagaccgagtgaccatcacagccgataagtctactagtaccgcctacatggag
 ctgagctccctgcggtctgaagataccgccgtctactattgcgctagaatttacggaaaca
 atgtctattttgacgtgtgggggcaggggaacaactgtgactgtctcctccggaggatgtgg
 cgggtggagaagtggccgcactggagaaagaggttgctgctttggagaaggaggtcgctgca
 cttgaaaaggaggtcgcagccctggagaaaggcgggcgggtctctggcccaggcaaaagagg
 cagccatccgcgaactggataaatatggcgtgagcgattattataagaacctgattgacaa
 cgcaaaatccgcggaaggcgtgaaagcactgattgatgaaattctggccgacctgcct

La segunda cadena polipeptídica de DART-2 c/ABD es la misma que la segunda cadena polipeptídica de DART-2 mencionada anteriormente (**SEQ ID NO:30**).

LOS DIACUERPOS MONOVALENTES BIESPECÍFICOS gpA33 X CD3 QUE TIENEN UN DOMINIO FC DE IGG («DART-2 C/FC»)

En otra implementación, la invención aporta diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 que tienen un dominio Fc de IgG. En consecuencia, se hace referencia en el presente a tales diacuerpos como «diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x ». El dominio Fc de los diacuerpos Fc de la presente invención puede ser una región Fc completa (por ejemplo, una región Fc completa de IgG) o bien solo un fragmento de una región Fc completa. Aunque el dominio Fc de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención puedan tener la capacidad para unirse a uno o más receptores Fc (por ejemplo, FcγR(s)), de preferencia, tal dominio Fc producirá una unión reducida a

FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (en relación con la unión que exhibe una región Fc de tipo salvaje) o eliminará sustancialmente la capacidad de tal dominio Fc para unirse a tal(es) receptor(es). El dominio Fc de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención puede incluir parte o la totalidad del dominio CH2 y/o la parte o la totalidad del dominio CH3 de una región Fc completa, o puede comprender una secuencia de una variante de CH2 o de una variante de CH3 (lo que puede incluir, por ejemplo, una o más inserciones y/o una o más deleciones, con respecto a los dominios CH2 y CH3 de una región Fc completa). El dominio Fc de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención puede comprender porciones Fc no polipeptídicas, o puede comprender porciones de regiones Fc no naturalmente completas, o puede comprender orientaciones de origen no natural de los dominios CH2 y CH3 (tal como, por ejemplo, dos dominios CH2 o dos dominios CH3 o, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal, un dominio CH3 vinculado a un dominio CH2, etc.).

En una primera implementación, denominada «versión 1», que se muestra en la **Figura 2A**, la primera cadena polipeptídica de un diacuerpo Fc monovalente biespecífico gpA33 x CD3 típico comprenderá, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal, un N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 o bien a CD3 (es decir, ya sea VL_{gpA33} o VL_{CD3}), un péptido espaciador interviniente (ligador 1), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (si la primera cadena polipeptídica contiene VL_{CD3}) o CD3 (si la primera cadena polipeptídica contiene VL_{gpA33}), un segundo péptido espaciador interviniente que contiene cisteína (ligador 2), un dominio promotor de heterodímeros, un péptido espaciador (ligador 5),

un péptido que contiene cisteína (péptido 1), un dominio Fc de IgG (de preferencia, parte o la totalidad de los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo), y un C-terminal.

En una segunda implementación, denominada «versión 2», que se muestra en la **Figura 2B**, la primera cadena polipeptídica de un diacuerpo Fc monovalente biespecífico gpA33 x CD3 típico comprenderá, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal, un N-terminal, un péptido que contiene cisteína (péptido 1), un dominio Fc de IgG (de preferencia, parte o la totalidad de los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo), un péptido espaciador interviniente (ligador 4), el dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 o bien a CD3 (es decir, ya sea VL_{gpA33} o VL_{CD3}), un péptido espaciador interviniente (ligador 1), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 (si la primera cadena polipeptídica contiene VL_{CD3}) o CD3 (si la primera cadena polipeptídica contiene VL_{gpA33}), un segundo péptido espaciador interviniente que contiene cisteína (ligador 2), un dominio promotor de heterodímeros, y un C-terminal.

De preferencia, en cualquiera de las implementaciones, el dominio Fc de la primera cadena polipeptídica producirá una unión reducida a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (en relación con la unión que exhibe una región Fc de tipo salvaje) o eliminará sustancialmente la capacidad de tal dominio Fc para unirse a tal(es) receptor(es). Formas variantes y mutantes de Fc capaces de mediar tales uniones modificadas son bien conocidas 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 ejemplo, US Patent No. 5,624,821, que se incorpora al presente, a modo de referencia). En una

implementación preferida, el dominio CH2 y CH3 incluyen una sustitución en la posición 234 con alanina y 235 con alanina.

La segunda cadena polipeptídica de tales diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 (versión 1 y versión 2) típicos comprenderá, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal, un N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a gpA33 o bien a CD3 (es decir, ya sea VL_{gpA33} o VL_{CD3}, dependiendo del dominio VL seleccionado para la primera cadena polipeptídica del diacuerpo), un péptido ligador interviniente (ligador 1), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (si la segunda cadena polipeptídica contiene VL_{gpA33}) o gpA33 (si la segunda cadena polipeptídica contiene VL_{CD3}), un péptido espaciador interviniente que contiene cisteína (ligador 2), un dominio promotor de heterodímeros (de preferencia un dominio enrollado K) y un C-terminal.

Los diacuerpos Fc monovalentes biespecífico gpA33 x CD3 (versión 1 y versión 2) típicos comprenderán además una tercera cadena polipeptídica que comprenderá, en el sentido del extremo N-terminal al extremo C-terminal, un N-terminal, un péptido que contiene cisteína (péptido 1), un dominio Fc de IgG (de preferencia, parte o la totalidad de los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo) que tiene el mismo isotipo que el que tiene el dominio Fc de la primera cadena polipeptídica, y un C-terminal. De preferencia, el dominio Fc de la tercera cadena polipeptídica producirá una unión reducida a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (en relación con la unión que exhibe una región Fc de tipo salvaje) o eliminará sustancialmente la capacidad de tal dominio Fc para unirse a tal(es) receptor(es), tal como se mencionó anteriormente, con respecto a la primera cadena polipeptídica de los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 típicos.

El péptido espaciador interviniente (ligador4), opcionalmente presente, comprenderá, de preferencia, la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:37**): APSSS, y más preferentemente, tienen la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:38**): APSSSPME.

El péptido que contiene cisteína (péptido 1) de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas puede estar compuesto de la misma secuencia de aminoácidos o de diferentes secuencias de aminoácidos, y contendrá 1, 2, 3 o más residuos de cisteína. Un péptido 1 particularmente preferido tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:39**): DKTHTCPPCP.

El péptido espaciador interviniente preferido (ligador 1) tiene la secuencia **SEQ ID NO:1**, descrita anteriormente. El péptido espaciador interviniente que contiene cisteína preferido (ligador 2) tiene, de preferencia, la secuencia **SEQ ID NO:2**, descrita anteriormente.

El dominio promotor de heterodímero de la primera y la segunda cadenas polipeptídicas de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 será, de preferencia, el dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**) y el dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**), descritos anteriormente, y se seleccionará de modo que una de dichas cadenas polipeptídicas posea un dominio enrollado E, mientras el otro posea un dominio enrollado K, como se mencionó anteriormente.

Un péptido espaciador preferido (ligador 5) tiene la secuencia GGG.

Los dominios CH2 y/o CH3 del primer y el tercer polipéptidos no tienen que ser idénticos, y se modifican ventajosamente para fomentar la complejidad entre los dos polipéptidos. Por ejemplo, puede introducirse una sustitución de aminoácidos (de preferencia, una sustitución con un

aminoácido que comprende un grupo lateral voluminoso que forma una 'protuberancia', por ejemplo, el triptófano) en el dominio CH2 o CH3, de tal manera que la interferencia estérica evitará la interacción con un dominio mutado en forma similar y obligará al dominio mutado a aparearse con un dominio en el que se ha diseñado una mutación complementaria o acomodaticia, es decir, 'la cavidad' (por ejemplo, una sustitución con glicina). Tales conjuntos de mutaciones pueden diseñarse en cualquier par de polipéptidos que comprendan la molécula del diacuerpo Fc monovalente biespecífico y, más aún, introducirse en cualquier parte de las cadenas polipeptídicas de dicho par. Los métodos de ingeniería de proteínas para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización son bien conocidos en la técnica, en particular con respecto a la ingeniería de moléculas similares a inmunoglobulina, y se abarcan en el 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 Of A Homodimer Using A Phage Display Library," J. Mol. Biol. 270: 26-35, and Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispespecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis," J. Immunol. Methods 296:95-101; cada uno de los cuales se adjunta en su totalidad al presente, a modo de referencia. De preferencia, la 'protuberancia' se diseña en los dominios CH2-CH3 de la primera cadena polipeptídica y la 'cavidad' se diseña en los dominios CH2-CH3 de la tercera cadena polipeptídica. Por lo tanto, la 'protuberancia' ayudará a evitar que la primera cadena polipeptídica se homodimerice a través de sus dominios CH2 y/o CH3. Como la tercera cadena polipeptídica contiene, de preferencia, la sustitución 'protuberancia', se

heterodimeriza con la primera cadena polipeptídica, así como se homodimeriza consigo misma. Se crea una protuberancia preferida, mediante la modificación de un dominio Fc de una región Fc nativa de IgG para que contenga la modificación T366W. Se crea una cavidad preferida, mediante la modificación de un dominio Fc de una región Fc nativa de IgG para que contenga las modificaciones T366S, L368A e Y407V. Para ayudar en la purificación de homodímero de la tercera cadena polipeptídica del diacuerpo Fc monovalente biespecífico final que comprende la primera, la segunda y la tercera cadenas polipeptídicas, el sitio de unión a la proteína A de los dominios CH2 y CH3 de la tercera cadena polipeptídica se muta, de preferencia, por un aminoácido de sustitución en la posición 435 (H435R). Para ayudar en la purificación de homodímero de la tercera cadena polipeptídica del diacuerpo Fc monovalente biespecífico final que comprende la primera, la segunda y la tercera cadenas polipeptídicas, el sitio de unión a la proteína A de los dominios CH2 y CH3 de la tercera cadena polipeptídica se muta, de preferencia, por un aminoácido de sustitución. Por lo tanto, el homodímero de la tercera cadena polipeptídica no se unirá a la proteína A, mientras que el diacuerpo Fc monovalente biespecífico retendrá su capacidad para unirse a la proteína A a través del sitio de unión a la proteína A de la primera cadena polipeptídica.

Una secuencia preferida para los dominios CH2 y CH3 de un dominio Fc de anticuerpo presente en la primera cadena polipeptídica es (**SEQ ID NO:40**):

```
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

Una secuencia preferida para los dominios CH2 y CH3 de un dominio Fc de anticuerpo presente en la tercera cadena polipeptídica es (**SEQ ID NO:41**):

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK

DART-2 C/FC VERSIÓN 1

La primera, la segunda y la tercera cadenas polipeptídicas de un diacuerpo Fc monovalente biespecífico gpA33 x CD3 preferido, designado en lo sucesivo «DART-2 c/Fc versión 1», comprende dominios polipeptídicos que tienen las siguientes secuencias:

La primera cadena polipeptídica de DART-2 c/Fc versión 1 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:42**):

DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCSARSSISFMYWYQQKPGKAPKLLIYDTS
NLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLSLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIKGGGSGG
GGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYA
TYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL
VTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Como se apreciará, los residuos 1- 106 de **SEQ ID NO:42** son el dominio VL de un anticuerpo que se une a gpA33 (**VL_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:26**); los residuos 107-114 de **SEQ ID NO:42** son el primer péptido espaciador interviniente (ligador 1) (**SEQ ID NO:1**); los residuos 115-239 de **SEQ ID NO:42** son el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD3 (**VH_{CD3}**) (**SEQ ID NO:25**), los residuos 240-245 de **SEQ ID NO:42** son un péptido espaciador que contiene cisteína (ligador 2) (**SEQ ID NO:2**); los residuos 246-273 de **SEQ ID NO:42** son el dominio enrollado

E promotor de heterodímeros (**SEQ ID NO:3**); los residuos 274-276 son el péptido espaciador GGG(ligador 5); los residuos 277-286 son el péptido 1 (**SEQ ID NO:39**), los residuos 277-503 son la secuencia para los dominios CH2 y CH3 de un dominio Fc de anticuerpo (**SEQ ID NO:40**) .

Un polinucleótido preferido que codifica la primera cadena polipeptídica de DART-2 c/Fc versión 1 tiene la secuencia (**SEQ ID NO:43**) :

```
gacattcagctgactcagtcacctctctttctgtccgcatccgtcggagat
cgagtgactattacttgctctgctaggtcctcaatcagcttcatgtactggtatcagcaga
agcccggcaaagcacctaagctgctgatctacgacacaagcaacctggcctccgggggtgcc
atctcggttctctggcagtgggtcaggaactgagtttacctgacaattagctccctggag
gctgaagatgccgctacctactattgccagcagtgaggcagctatcctctgaccttcggac
aggggactaaactggaaatcaaggggtggaggatccggcggcggaggcgaggtgcagctggg
ggagtctgggggaggcttgggtccagcctggaggggtccctgagactctcctgtgcagcctct
ggattcaccttcagcacatacgtatgaattgggtccgccagggtccagggaaggggctgg
agtgggttggaaggatcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgt
gaaggatagattcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaataaac
agcctgaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaatt
cttacgtgtcttggtttgcttattggggacaggggacactgggtgactgtgtcttccggagg
atgtggcgggtggagaagtggccgcactggagaaaagaggttgctgctttggagaaggaggtc
gctgcacttgaaaaggaggtcgcagccctggagaaaaggcggcggggacaaaactcacacat
gcccaccgtgccagcacctgaagccgcggggggaccgtcagtccttctcttcccccaaa
accaaggacaccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgctgtggtgggtggacgtg
agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatg
ccaagacaaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcac
cgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagcc
ctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg
tgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgcct
ggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggag
aacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctccttcttctctacagca
agctcacctgggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgca
tgagggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
```

La segunda cadena polipeptídica de DART-2 c/Fc versión 1 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:44**):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIG
GTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGSWMNWVRQAPGQGLEWIGRIYPGD
GETNYNGKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARIYGNNVYFDVWGQGTTVT
VSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Como se apreciará, los residuos 1-110 de **SEQ ID NO:44** son el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD3 (**VL_{CD3}**) (**SEQ ID NO:5**); los residuos 111-118 de **SEQ ID NO:44** son el primer péptido espaciador interviniente (ligador 1) (**SEQ ID NO:1**); los residuos 119-237 de **SEQ ID NO:44** son el dominio VH de un anticuerpo que se une a gpA33 (**VH_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:27**), los residuos 238-243 de **SEQ ID NO:44** son un péptido espaciador que contiene cisteína (ligador 2) (**SEQ ID NO:2**) y los residuos 244-271 de **SEQ ID NO:44** son el dominio enrollado K promotor de heterodímeros (**SEQ ID NO:4**).

Un polinucleótido preferido que codifica la segunda cadena polipeptídica de DART-2 c/Fc versión 1 tiene la secuencia (**SEQ ID NO:45**):

caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcggaact
gtgaccctgacatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaattggg
tgcagcagaagccaggacaggcaccaaggggcctgatcggggtacaaacaaaagggtcc
ctggaccctgcacggttttctggaagtctgctgggcggaaaggccgctctgactattacc
ggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgttggtatagcaatctgtggg
tgttcgggggtggcacaaaactgactgtgctgggaggggtggatccggcggaggtggaca
ggtccagctggtccagagcggggccgaagtcaaaaaacccggagcaagcgtgaaggtctcc
tgcaaagcatcaggctatacatttacaggcagctggatgaactgggtgaggcaggctccag
gacagggactggagtggatcgggcgcacatctaccctggagacggcgaaactaactataatgg
aaagttcaaagaccgagtgaccatcacagccgataagtctactagtaccgcctacatggag
ctgagctccctgcggtctgaagataccgccgtctactattgcgctagaatttacggaaaca
atgtctattttgacgtgtgggggcagggaacaactgtgactgtctcctccggaggatgtgg

cggtggaaaagtggccgcactgaaggagaaagttgctgctttgaaagagaaggctcgccgca
cttaaggaaaaggctcgagccctgaaagag

La tercera cadena polipeptídica de DART-2 c/Fc versión 1 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:46**):

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNRYTQKSLSLSPGK

Como se apreciará, los residuos 1-10 de **SEQ ID NO:46** son el péptido 1 (**SEQ ID NO:39**) y los residuos 11-227 son los dominios CH2 y CH3 de un dominio Fc de anticuerpo (**SEQ ID NO:41**).

Un polinucleótido preferido que codifica la tercera cadena polipeptídica de DART-2 c/Fc versión 1 tiene la secuencia (**SEQ ID NO:47**):

gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgcgggggga
ccgtcagtccttcttcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctg
aggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggta
cgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagc
acgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagt
acaagtgcagggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagc
caaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgacc
aagaaccagggtcagcctgagttgcgcagtcacaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtgg
agtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactc
cgacggctccttcttctcgtcagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccgctacacgcagaagagcc
tctccctgtctccggtaaa

DART-2 c/Fc versión 2

La primera, la segunda y la tercera cadenas polipeptídicas de un segundo diacuerpo Fc monovalente biespecífico gpA33 x CD3 preferido, designado en lo sucesivo «DART-2 c/Fc versión 2», comprende dominios polipeptídicos que tienen las siguientes secuencias. Entre otras

diferencias, DART-2 c/Fc versión 1 difiere de DART-2 c/Fc versión 2 en el posicionamiento de las secuencias de CH2 y CH3 de la primera cadena polipeptídica; estas secuencias se posicionan en la dirección de C-terminal de las secuencias de VL y VH de DART-2 c/Fc versión 1, mientras que se posicionan en la dirección de N-terminal de las secuencias de VL y VH de DART-2 c/Fc versión 2.

La primera cadena polipeptídica de DART-2 c/Fc versión 2 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:48**):

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAPSSSPM
EDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCSARSSISFMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLASGVPSR
FSGSGSGTEFTLTITSSLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIKGGGSGGGGEVQLVES
GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKD
RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVSSGGCG
GGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Como se apreciará, los residuos 1-10 de **SEQ ID NO:48** son el péptido 1 (**SEQ ID NO:39**); los residuos 11-227 de **SEQ ID NO:48** son la secuencia para los dominios CH2 y CH3 de un dominio Fc de anticuerpo (**SEQ ID NO:40**); los residuos 228-235 de **SEQ ID NO:48** son el péptido espaciador interviniente (ligador 4) (**SEQ ID NO:38**); los residuos 236-341 de **SEQ ID NO:48** son el dominio VL de un anticuerpo que se une a gpA33 (**VL_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:26**); los residuos 342-349 de **SEQ ID NO:48** son el primer péptido espaciador interviniente (ligador 1) (**SEQ ID NO:1**); los residuos 350-474 de **SEQ ID NO:48** son el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD3 (**VH_{CD3}**) (**SEQ ID NO:25**); los residuos 475-480 de **SEQ ID NO:48** son el péptido espaciador (ligador 2) (**SEQ ID NO:2**); los residuos 481-508 de **SEQ ID NO:48** son el dominio enrollado K promotor de heterodímeros (**SEQ ID NO:4**).

La segunda cadena polipeptídica de DART-2 c/Fc versión 2 tiene la secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica de DART-2 (es decir, **SEQ ID NO:28**), descripta anteriormente.

La tercera cadena polipeptídica de DART-2 c/Fc versión 2 tiene la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO:46**, descripta anteriormente.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Las composiciones de la presente invención incluyen composiciones de fármacos a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente), que pueden usarse en la preparación de formas farmacéuticas unitarias. Tales composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 descritos en el presente, un agente terapéutico adicional y un vehículo farmacéuticamente aceptable. De preferencia, las composiciones de la presente invención comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también abarca composiciones farmacéuticas que comprenden tales diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 y un segundo anticuerpo terapéutico (por ejemplo, anticuerpo monoclonal específico para un antígeno tumoral) que es específico para un antígeno en particular asociado con un cáncer, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una implementación específica, el término «farmacéuticamente aceptable» significa aprobado por un ente regulador del gobierno nacional o estatal/provincial o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término «vehículo» se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de petróleo, animales, vegetales o sintéticos, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es el vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y similares.

Por lo general, los ingredientes de las composiciones de la presente invención se suministran por separado o mezclados juntos en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado, tal

como una ampolla o bolsa, en la que se indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se ha de administrar por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o solución salina. Cuando la composición se administra por inyección, se puede suministrar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Las composiciones de la presente invención se pueden formular como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otras, las formadas con aniones, tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos de hierro, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

La invención también abarca un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases llenos de tales diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 descritos (solos o con agente(s) terapéutico(s) adicional(es)) y tal vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, también se pueden incluir en el paquete o kit farmacéutico uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad. La invención también abarca un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases llenos de uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Opcionalmente asociada a dicho(s) envase(s) puede haber una notificación en la forma prescrita por la agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la

aprobación emitida por la agencia en relación con la fabricación, el uso o la venta para la administración a humanos.

La presente invención abarca kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una implementación, un kit comprende una o más moléculas de la presente invención. En otra implementación, un kit comprende además uno o más agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de un cáncer, en uno o más envases. En otra implementación, un kit comprende además uno o más anticuerpos que se unen a uno o más antígenos asociados a un cáncer. En ciertas implementaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente quimioterapéutico. En otras implementaciones, el agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico biológico u hormonal.

Usos de las composiciones de la invención

Los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención tienen la capacidad para tratar cualquier enfermedad o afección asociada con gpA33 o caracterizada por la expresión de gpA33. Por lo tanto, composiciones farmacéuticas que comprenden tales moléculas pueden emplearse sin limitación en el diagnóstico o tratamiento de cánceres de colon, colorrectales y pancreáticos.

Métodos de administración

Las composiciones de la presente invención se pueden proporcionar para el tratamiento, la profilaxis y la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la invención. En un aspecto preferido, dichas composiciones están sustancialmente purificadas (es decir, sustancialmente

libres de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). En una implementación específica, el sujeto es un animal, de preferencia un mamífero no primate (por ejemplo, bovino, equino, felino, canino, roedor, etc.) o primate (por ejemplo, mono tal como mono cynomolgus, humano, etc.). En una implementación preferida, el sujeto es un humano.

Se conocen varios sistemas de entrega que pueden usarse para administrar las composiciones de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar la proteína del anticuerpo o 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: 4.429-4.432), construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, etc.

Los métodos de administración de los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención incluyen, entre otros, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, por vía intranasal u oral). En una implementación específica, las moléculas de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede emplearse la administración pulmonar,

por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizador. Véase, por ejemplo, U.S. Patent Nos. 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y PCT Publication 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 su totalidad al presente, a modo de referencia.

La invención también prevé que los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención se envasen en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsa, en las que se indique la cantidad de tales moléculas. En una implementación los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención se suministran como polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado y pueden ser reconstituidos, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración adecuada para administración a un sujeto. De preferencia, los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente cerrado a una dosis unitaria de al menos 5 µg, más preferiblemente, 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.

Los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 liofilizados de la presente invención deben almacenarse a entre 2 y 8 °C en su recipiente original y las moléculas deben administrarse dentro de un plazo de 12 horas, de preferencia dentro de un plazo de 6 horas, dentro de un plazo

de 5 horas, dentro de un plazo de 3 horas o dentro de un plazo de 1 hora, a contar de la reconstitución. En una implementación alternativa, los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsa, en las que se indican la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión o molécula conjugada. De preferencia, la forma líquida de tales diacuerpos monovalentes biespecíficos o diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos se suministra en un recipiente herméticamente sellado en el cual las moléculas se presentan a una concentración de al menos 1 µg/ml, más preferiblemente, al menos 2,5 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 50 µg/ml o al menos 100 µg/ml.

Se puede determinar la cantidad de diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o de diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención que será eficaz en el tratamiento, la prevención o mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno, a través de técnicas clínicas normales. La dosis exacta a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la afección, y debe ser determinada de acuerdo con la opinión del médico a cargo y de las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de las curvas de respuesta a dosis derivadas de los sistemas de ensayo de modelos *in vitro* o animales.

Para los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 abarcados por la invención, la dosificación administrada a un paciente es, típicamente, de al menos cerca de 0,01 µg/kg, al menos cerca de 0,05 µg/kg, al menos cerca

de 0,1 µg/kg, al menos cerca de 0,2 µg/kg, al menos cerca de 0,5 µg/kg, al menos cerca de 1 µg/kg, al menos cerca de 2 µg/kg, al menos cerca de 3 µg/kg, al menos cerca de 5 µg/kg, al menos cerca de 10 µg/kg, al menos cerca de 20 µg/kg, al menos cerca de 30 µg/kg, al menos cerca de 50 µg/kg, al menos cerca de 0,1 mg/kg, al menos cerca de 0,15 mg/kg o más del peso corporal del sujeto.

La dosificación y la frecuencia de la administración de los diacuerpos monovalentes biespecíficos o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención pueden reducirse o modificarse por medio de la mejora del consumo y la penetración en los tejidos de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos como consecuencia de modificaciones tales como, por ejemplo, de lipidadión.

En una implementación, la dosificación de diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención administrados a un paciente se puede calcular para uso como único agente terapéutico. En otra implementación, los diacuerpos monovalentes biespecíficos o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención se usan en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosificación administrada a un paciente es más baja que cuando dichos diacuerpos monovalentes biespecíficos o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos se usan como único agente terapéutico.

En una implementación específica, puede ser indicado administrar las composiciones farmacéuticas de la presente invención localmente en el área que necesita tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, entre otros medios, por infusión local, por inyección o por medio de un implante; implante éste que puede ser de material poroso, no poroso o gelatinoso, tal como membranas sialásticas o fibras.

De preferencia, al administrar una molécula de la presente invención, se debe tener cuidado de usar materiales que no absorben la molécula.

En otra implementación, las composiciones pueden entregarse 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. 3 17-327; véase generalmente ibid.).

En otra implementación, las composiciones pueden entregarse en un sistema de liberación controlada o prolongada. Se puede usar cualquier técnica conocida como de buena práctica para producir la liberación prolongada de formulaciones que comprenden una o más moléculas de la presente invención. Véase, por ejemplo, U.S. Patent No. 4,526,938; PCT publication WO 91/05548; PCT publication WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; and Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, cada uno de los cuales se adjunta en su totalidad al presente, a modo de referencia. En una implementación, se puede usar una bomba 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; and 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 implementación, se pueden usar materiales poliméricos para lograr la liberación controlada de anticuerpos (véase, por ejemplo, MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate," Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization," Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits," J. Neurosurg. 7(1):105-112); U.S. Patent No. 5,679,377; U.S. Patent No. 5,916,597; U.S. Patent No. 5,912,015; U.S. Patent No. 5,989,463; U.S. Patent No. 5,128,326; PCT Publication No. WO 99/15154; y PCT Publication No. WO 99/20253). Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación prolongada incluyen, entre otros, poli (metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En otra implementación más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca del blanco terapéutico (por ejemplo, los pulmones), de modo de requerir solo una fracción de la dosis sistémica

(véase, por ejemplo, Goodson, en MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). En otra implementación, composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada se usan de acuerdo con Dunn *et al.* (Véase U.S. Patent 5,945,155). Este método en particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada *in situ* del material bioactivo del sistema polimérico. El implante puede hacerse, por lo general, en cualquier lugar del cuerpo del paciente, que necesite tratamiento terapéutico. En otra implementación, se usa un sistema de aplicación prolongada no polimérico, en el que se usa un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto, a modo de sistema de aplicación del medicamento. Luego del implante en el cuerpo, el solvente orgánico del implante se disipa, dispersa o lixivía de la composición en el fluido de los tejidos circundantes, y el material no polimérico se coagula o precipita para formar una matriz sólida microporosa (véase U.S. 5,888,533).

Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533). Se puede usar cualquier técnica conocida como de buena práctica para producir la liberación prolongada de formulaciones que comprenden una o más agentes terapéuticos de la presente invención. Véase, por ejemplo, U.S. Patent No. 4,526,938; International Publication Nos. WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.* (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control.

Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; and Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, cada uno de los cuales se adjunta en su totalidad al presente, a modo de referencia.

En una implementación específica en la que la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un diacuerpo monovalente biespecífico o diacuerpo Fc monovalente biespecífico de la presente invención, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión del diacuerpo monovalente biespecífico o diacuerpo Fc monovalente biespecífico que codifica, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se torne intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase U.S. Patent No. 4,980,286), o mediante inyección directa o el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, un cañón de genes; biolística, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo ligado a un péptido tipo secuencia homeótica que se conoce que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis," Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 88:1864-1868), etc. Alternativamente, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse a una célula de ADN del hospedador, para su expresión por recombinación homóloga.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 o diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de presente invención puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto es tratado

con moléculas de la presente invención una vez a la semana durante entre cerca de 1 a 10 semanas, de preferencia de 2 a 8 semanas, más preferentemente unas 3 a 7 semanas, y más preferentemente aún durante 4, 5 o 6 semanas. En otras implementaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. En otras implementaciones, las composiciones farmacéuticas se administran una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosificación eficaz de las moléculas usadas para tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo del curso de un tratamiento en particular.

Luego de esta descripción general de la invención, esta podrá entenderse mejor a través de los siguientes ejemplos, que se presentan a modo de ilustración y tienen la intención de ser limitantes de la presente invención, a menos que se especifique.

Ejemplo 1:

CARACTERÍSTICAS DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI GPA33 HUMANO

Se quimerizó y humanizó un anticuerpo monoclonal murino específico capaz de unirse a gpA33 humano. Las cadenas VL y VH del anticuerpo murino original tienen las secuencias **SEQ ID NOs:13** y **17**, respectivamente. Las cadenas VL y VH del anticuerpo humanizado tienen las secuencias **SEQ ID NOs:26** y **27**, respectivamente.

El dominio de unión a antígeno de VL_{gpA33} comprende CDR1 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:14**): SARSSISFMY; CDR2 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:15**): DTSNLAS; y CDR3 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:16**): QQWSSYPLT.

El dominio de unión a antígeno de VH_{gpA33} comprende CDR1 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:18**): GSWMN; CDR2 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:19**): RIYPGDGETNYNGKFKD; y CDR3 que tiene la secuencia (**SEQ ID NO:20**): IYGNNVYFDV.

La **Tabla 1** muestra el efecto de estas alteraciones en la cinética de unión.

Tabla 1			
Anticuerpo	KD	ka	kd
mAb 1 murino	2,3 nM	$3,3 \times 10^5$	$7,5 \times 10^{-4}$
mAb 1 quimérico	2,4 nM	$5,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-3}$
mAb 1 humanizado	3,4 nM	$5,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^{-3}$

Los datos indican que las modificaciones que dieron lugar a la humanización de los dominios VL y VH del anticuerpo no afectaron sustancialmente la cinética de unión a gpA33.

Ejemplo 2

CONSTRUCCIÓN	DE	DIACUERPOS	Y	DIACUERPOS	FC
MONOVALENTES	BIESPECÍFICOS	GPA33	X	CD3	
Y DIACUERPOS DE CONTROL					

La **Tabla 2** contiene una lista de las secuencias de las cadenas polipeptídicas de los diacuerpos gpA33 x CD3 y diacuerpos Fc gpA33 x CD3 preferidos, que fueron expresadas y purificadas. Se encontró que los diacuerpos son capaces de unirse simultáneamente a gpA33 y CD3, como se juzgó por la detección de tal unión simultánea de los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 , DART-1 y DART-2, típicos y por los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 (DART-2 c/Fc) típicos. Además, se produjo un diacuerpo monovalente biespecífico de control («Control DART»), que fue monovalente biespecífico para CD3 y FITC, y

se encontró que era capaz de unirse simultáneamente a CD3 y FITC.

Tabla 2	
Diacuerpo	Polipéptidos sustituyentes (en el sentido del extremo N- terminal al extremo C- terminal)
Diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (DART-1)	SEQ ID NO:21 SEQ ID NO:23
Diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (DART-2)	SEQ ID NO:28 SEQ ID NO:30
Diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio de unión a albúmina (DART-2 c/ABD) Comprende un dominio de unión a albúmina (ABD) para prolongación de la semivida <i>in vivo</i>	SEQ ID NO:35 SEQ ID NO:30
Diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio Fc de IgG versión 1 (DART-2 c/Fc versión 1) Comprende un dominio Fc para prolongación de la semivida <i>in vivo</i>	SEQ ID NO:42 SEQ ID NO:44 SEQ ID NO:46

Diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio Fc de IgG versión 2 (DART-2 c/Fc versión 2) Comprende un dominio Fc para prolongación de la semivida <i>in vivo</i>	SEQ ID NO:48 SEQ ID NO:28 SEQ ID NO:46
--	---

Los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 son heterodímeros compuestos por dos cadenas polipeptídicas (una cadena de cada secuencia indicada) y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 son heterotrímeros compuestos por tres cadenas polipeptídicas (una cadena de cada secuencia de aminoácido indicada). Los métodos de formación de diacuerpos monovalentes biespecíficos se encuentran en WO 2006/113665, WO 2008/157379, WO 2010/080538, WO 2012/018687, WO 2012/162068 y WO 2012/162067.

Se halló que el diacuerpo monovalente biespecífico CD3 x FITC de control es capaz de unirse simultáneamente a CD3 y FITC. Se halló que los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA3 x CD3 descritos anteriormente son capaces de unirse simultáneamente a gpA33 y CD3. Con el fin de demostrar dicha unión simultánea, se incubó el diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 DART-1 en presencia de un fragmento soluble de CD3 que se había inmovilizado en un soporte sólido. La detección de la unión se evaluó por la capacidad de los anticuerpos inmovilizados para unirse además a gpA33. Los resultados confirman la capacidad de los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos gpA3 x CD3 descritos anteriormente para unirse simultáneamente a gpA33 y (**Figura 3**).

Ejemplo 3LOS DIACUERPOS MONOVALENTES BIESPECÍFICOS gpA33 X CD3 SON CITOTÓXICOS PARA CÉLULAS CANCEROSAS

La capacidad de los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención para tratar cáncer se ilustró a través de la incubación de células de cáncer colorrectal o cáncer pancreático en presencia del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (DART-1) y PBMC humanas (E:B = 25:1) o bien células T humanas activadas (E:B = 10:1). El diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 DART-1 mostró una potente capacidad de lisis redirigida, a concentraciones necesarias para alcanzar el 50 % de actividad máxima (EC50) en el rango de sub ng/ml a alrededor de 1 ng/ml. Por lo contrario, no se observó citotoxicidad al emplearse líneas celulares de cáncer negativas para gpA33 (por ejemplo, HCT116). Los resultados de la investigación se muestran en la **Figura 4A** (células tipo troncales de cáncer colorrectal (células CSCL de colon), la **Figura 4B** (células colorrectales Colo205) y la **Figura 4C** (células de cáncer pancreático ASPC-1). Los resultados se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3			
Línea de células blanco	EC50 del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (en ng/ml)	Efector:Blanco (E:B)	Máx. % de lisis Observado
CSLC de colon	0,9015	25:1	38
Colo205	0,5853	10:1	35
ASPC-1	1,142	10:1	25

Ejemplo 4

ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T EN PRESENCIA DE DIACUERPOS
MONOVALENTES BIESPECÍFICOS GPA33 X CD3

A los fines de demostrar también la capacidad de los diacuerpos de la presente invención para tratar cáncer, se incubaron células T humanas en reposo con DART-1 monovalente biespecífico gpA33 x CD3 en presencia o ausencia de células cancerosas (colo205 o ASPC-1). Para caracterizar la activación de las células T durante el proceso de lisis redirigida mediado por el gpA33 x CD3 diacuerpo monovalente biespecífico (DART-1), las células T de los ensayos de lisis redirigida se tiñeron para el marcador CD25 de activación de células T y se analizaron mediante FACS. CD25 aumentó en las células T CD8 (**Figuras 5A-5B**) y CD4 (**Figuras 5D-5E**) de en forma dependiente de la dosis, lo que indica que los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 indujeron la activación de las células T en el proceso de lisis redirigida. Por el contrario, en ausencia de células blanco no activación de células T CD8 (**Figura 5C**) o CD4 (**Figura 5F**), lo que indica que los diacuerpos gpA33 x CD3 no activaron las células T en ausencia de células blanco. Asimismo, las células T CD8 o CD4 no se activaron cuando se incubaron con células blanco y un diacuerpo monovalente biespecífico de control (Control DART) (**Figuras 5A-5B, y Figuras 5D-5F**, respectivamente), lo que indica el requisito de la unión cruzada de la célula T y la célula blanco con diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3.

Ejemplo 5

EQUIVALENCIA DEL DIACUERPO MONOVALENTE BIESPECÍFICO
GPA33 X CD3 (DART-1) QUE TIENE SECUENCIAS DE DOMINIOS
VARIABLES ANTI GPA33 HUMANO MURINOS Y EL DIACUERPO
MONOVALENTE BIESPECÍFICO GPA33 X CD3 (DART-2) QUE TIENE
SECUENCIAS DE DOMINIOS VARIABLES ANTI GPA33 HUMANO
HUMANIZADOS

Como se mencionó anteriormente, el diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 DART-1 contiene dominios VL_{gpA33} y VH_{gpA33} de un anticuerpo monoclonal murino, mientras el diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 DART-2 contiene dominios VL_{gpA33} y VH_{gpA33} humanizados del mismo anticuerpo murino. A fin de demostrar la capacidad de los dominios VL_{gpA33} y VH_{gpA33} humanizados para promover que las células T tuvieran como blanco las células cancerosas que expresan la gpA33, se incubaron células cancerosas que expresan la gpA33 en presencia de células T en reposo (Análisis de LDH; E:B = 10:1) in presencia de DART-1, DART-1 o un diacuerpo monovalente biespecífico de control (Control DART). Los resultados de este análisis (mostrados en las **Figuras 6A-6D**) demuestran que DART-1 y DART-2 mediaron la citotoxicidad equivalente para células de adenocarcinoma colorrectal SW948 (**Figura 6A**) y células colo205 (**Figura 6B**). Tanto DART-1 como DART-2 mediaron la citotoxicidad de una luciferasa que expresa una línea celular de Colo205 que fue transfectada establemente con un gen de luciferasa de luciérnaga (luc2) (Colo205-Luc), como se midió por luminiscencia disminuida (**Figura 6C**). Ni DART-1 ni DART-2 mediaron la citotoxicidad de la línea celular cancerosa negativa para gpA33, HCT116 (**Figura 6D**). Como se muestra en la **Tabla 4**, DART-1 y DART-2 exhibieron bioactividad equivalente similar contra múltiple líneas celulares tumorales.

Tabla 4					
Efector/Blanco		Análisis de LDH		Análisis de luciferasa	
Donador Célula T	Línea de células	gpA33xCD3 DART-2	gpA33xCD3 DART 1	gpA33xCD3 DART-2	gpA33xCD3 DART 1

	tumorales				
D54677	SW948	0,79	1,34		
D54677	Colo205	1,17	2,52		
D51031	Colo205- Luc	2,29	3,53	2,53	4,55
D41440	Colo205	2,29	3,37		
D41440	Colo205- Luc	2,80	4,26	2,57	3,26

Ejemplo 6

REACTIVIDAD CRUZADA DE LOS DIACUERPOS MONOVALENTES BIESPECÍFICOS GPA33 X CD3, DIACUERPOS MONOVALENTES BIESPECÍFICOS GPA33 X CD3 QUE TIENEN UN DOMINIO DE UNIÓN A ALBÚMINA Y DIACUERPOS MONOVALENTES BIESPECÍFICOS GPA33 X CD3 QUE TIENEN UN DOMINIO FC DE IGG CON PBMC DE MONO CYNOMOLGUS

Como se mostró anteriormente, los dominios VL_{gpA33} y VH_{gpA33} humanizados del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 DART-2 median la citotoxicidad de células cancerosas que expresan gpA33 en presencia de células T humanas. Sorpresivamente, se encontró que los dominios VL_{CD3} y VH_{CD3} de los diacuerpos monovalentes biespecíficos gpA33 x CD3 de la presente invención también son capaces de unirse al CD3 de células T de mono cynomolgus y redirigirlas para destruir células que expresan gpA33.

Como se muestra en las **Figuras 7A-7D**, se encontró que el diacuerpo DART-2 monovalente biespecífico gpA33 x CD3, el diacuerpo DART-2 monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio de unión a albúmina (DART-2 c/ABD) y el diacuerpo DART-2 monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio Fc de IgG (DART-2 c/Fc) son todos capaces de promover la citotoxicidad de las células cancerosas en

presencia de PBMC humanas o de mono cynomolgus. Las **Figuras 7A-7B** muestran la capacidad de los tres diacuerpos para mediar la citotoxicidad de las células Colo205-Luc que se incubaron con PBMC humano, medido por análisis de LDH (**Figura 7A**) o luciferasa (**Figura 7B**). Las **Figuras 7C-7D** muestran la capacidad correspondiente de los tres diacuerpos para mediar la citotoxicidad de las células Colo205-Luc que se incubaron con PBMC de mono cynomolgus, medido por análisis de LDH (**Figura 7A**) o luciferasa (**Figura 7B**).

Como se recoge en la **Tabla 5**, el diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 DART-2 y el diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio de unión a albúmina (DART-2 c/ABD) mostraron una actividad CLT comparable. Los diacuerpos monovalentes biespecíficos exhibieron actividad consistente con células efectoras PBMC tanto humanas como de mono cynomolgus (cyno).

Tabla 5				
	EC50 - Actividad CTL (ng/ml)			
	Células blanco Colo205			
	Análisis de LDH		Análisis de luciferasa	
DART	PBMC humana	PBMC de cyno	PBMC humanas	PBMC de cyno
Diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (DART-2)	4,09	3,81	2,73	1,55
Diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un	5,52	4,63	3,07	1,63

dominio de unión a albúmina (DART-2 c/ABD)				
--	--	--	--	--

Ejemplo 7

REACTIVIDAD IN VIVO DE DIACUERPO GPA33 X CD3 EN
MODELO DE TUMOR DE COLON MURINO

Con el fin de demostrar la capacidad *in vivo* de los diacuerpos gpA33 x CD3 de la presente invención para proporcionar un tratamiento para el cáncer, se coimplantaron células Colo205 con células T activadas en ratones NSG (NOD scid gamma) inmunodeficientes (Agliano, A. et al. (2008) "Human Acute Leukemia Cells Injected In NOD/Ltsz-Scid/IL-2Rgamma Null Mice Generate A Faster And More Efficient Disease Compared To Other NOD/Scid-Related Strains," Int. J. Cancer 123(9):2222-2227; Sanchez, P.V. et al. (2009) "A Robust Xenotransplantation Model For Acute Myeloid Leukemia," Leukemia 23(11):2109-2117; Racki, W.J. et al. (2010) "NOD-Scid IL2rgamma(Null) Mouse Model Of Human Skin Transplantation And Allograft Rejection," Transplantation 89(5):527-536; Choi, B. et al. (2011) "Human B Cell Development And Antibody Production In Humanized NOD/SCID/IL-2Rγ(Null) (NSG) Mice Conditioned By Busulfan," J. Clin. Immunol. 31(2):253-264; Sartelet, H. et al. (2012) "Description Of A New Xenograft Model Of Metastatic Neuroblastoma Using NOD/SCID/Il2rg Null (NSG) Mice," In Vivo 26(1):19-29; Spranger, S. et al. (2012) "NOD/scid IL-2Rg(null) Mice: A Preclinical Model System To Evaluate Human Dendritic Cell-Based Vaccine Strategies *in vivo*," J. Transl. Med. 10:30; von Bonin, M. et al. (2013) "in vivo Expansion Of Co-Transplanted T Cells Impacts On Tumor Re-Initiating Activity Of Human Acute Myeloid Leukemia In NSG Mice," PLoS One. 8(4):e60680).

El diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 DART-1 se administró a los ratones por vía IV una vez al día durante 4 días (QDx4) a partir del implante. Se encontró que el volumen del tumor Colo205 aumentó en los ratones que recibieron el vehículo de control (**Figura 8**). Sin embargo, en los animales que recibieron DART-1 se encontró que el volumen del tumor Colo205 había disminuido o desaparecido (**Figura 8**).

Imágenes de ratones NSG implantados con células Colo205 mostraron que al segundo día de tratamiento, los ratones que recibieron el vehículo (**Figura 9A**) o el diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 DART-1 (**Figura 9B**) tenían tumores significativos. Sin embargo, el día 12 de tratamiento, en los ratones que recibieron el diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 DART-1 el volumen de los tumores había disminuido drásticamente (**Figura 9D**). El día 12 de tratamiento, los ratones que recibieron el vehículo mostraron un aumento en el volumen de los tumores (**Figura 9C**).

Como mayor evidencia de la capacidad *in vivo* de los diacuerpos gpA33 x CD3 de la presente invención para proporcionar un tratamiento para el cáncer, el modelo tumoral descrito anteriormente se llevó a cabo usando a células tumorales pancreáticas ASPC-1 y células T activadas (E:B = 1:1). El diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 DART-1, un diacuerpo monovalente biespecífico de control (Control DART), o un vehículo se administraron por vía IV una vez al día durante 9 días (QDx9) a partir del implante. Se encontró que el volumen del tumor ASPC-1 aumentó en los ratones que recibieron el vehículo de control (**Figura 10**). Sin embargo, en los animales que recibieron DART-1 se encontró que una reducción, dependiente de la dosis, del volumen del tumor (**Figura 10**).

Ejemplo 8

DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DEL DIACUERPO
MONOVALENTE BIESPECÍFICO GPA33 X CD3 QUE TIENE UN DOMINIO FC
DE IGG VERSIÓN 1 (DART-2 C/FC VERSIÓN 1)

A fin de determinar la eficacia del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio Fc de IgG versión 1 (DART-2 c/Fc versión 1), durante 7 días, los ratones recibieron la infusión (con bombas osmóticas) del DART-2 c/Fc versión 1 descripto anteriormente, a diferentes niveles de dosificación. 48 h después del implante de la bomba (es decir, en presencia de un nivel de circulación estable de DART-2 c/Fc versión 1), se implantó una mezcla de células tumorales Colo205 y células T por vía subcutánea en los ratones, y se monitoreó la extensión del crecimiento del tumor. En la **Tabla 6** se resume el diseño del estudio; cada grupo contenía 8 ratones hembras.

Tabla 6				
Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Vía / Pauta	Implante(s) celular(es)
1	Vehículo	0	IV/QDx5	COLO205 (5E6)
2	Diacuerpo monovalente biespecífico gpA33xCD3 que tiene un dominio Fc de IgG (DART-2 c/Fc versión 1)	3,1	IP/CIF	COLO205 (5E6) Células T humanas (5E6)
3	DART-2 c/Fc versión 1	1,5	IP/CIF	COLO205 (5E6) Células hT (5E6)
4	DART-2 c/Fc versión 1	0,75	IP/CIF	COLO205 (5E6) Células hT (5E6)

Tabla 6				
Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Vía / Pauta	Implante(s) celular(es)
5	DART-2 c/Fc versión 1	0,375	IP/CIF	COLO205 (5E6) Células hT (5E6)
6	DART-2 c/Fc versión 1	0,50.5	IV/QDx5	COLO205 (5E6) Células hT (5E6)

Los resultados de este estudio se recogen en la **Figura 11**, e indican que la administración del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio Fc de inmunoglobulina IgG (DART-2 c/Fc Versión 1) descripto anteriormente medió una drástica reducción en el volumen del tumor a todas las dosificaciones ensayadas.

A la luz de la dramática reducción en el volumen del tumor que se obtuvo en el estudio anterior, se llevó a cabo un estudio adicional, para evaluar la eficacia a dosis mucho más bajas. En la **Tabla 7** se resume el diseño de este estudio posterior; cada grupo contenía 8 ratones hembras.

Tabla 7				
Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Vía / Pauta	Implante(s) celular(es)
1	Vehículo	0	IV/QDx5	COLO205 (5E6)
2	Diacuerpo monovalente biespecífico gpA33xCD3 que tiene un dominio	0,2	IP/CIF	COLO205 (5E6) Células hT (5E6)

Tabla 7				
Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Vía / Pauta	Implante(s) celular(es)
	Fc de IgG (DART-2 c/Fc versión 1)			
3	DART-2 c/Fc versión 1	0,04	IP/CIF	COLO205 (5E6) Células hT (5E6)
4	DART-2 c/Fc versión 1	0,008	IP/CIF	COLO205 (5E6) Células hT (5E6)
5	DART-2 c/Fc versión 1	0,0016	IP/CIF	COLO205 (5E6) Células hT (5E6)
6	DART-2 c/Fc versión 1	0,50.5	IV/QDx5	COLO205 (5E6) Células hT (5E6)

Los resultados de este estudio posterior se recogen en la **Figura 12**. En la **Figura 12**, cada símbolo representa un animal que recibió la dosis que se indica del diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio Fc de IgG versión 2 (DART-2 c/Fc versión 1) descripto anteriormente o vehículo. Los datos muestran la eficacia a todas las dosis ensayadas.

Ejemplo 9

PERFIL FARMACOCINÉTICO DEL DIACUERPO MONOVALENTE BIESPECÍFICO GPA33 X CD3 (DART-2) Y DEL DIACUERPO MONOVALENTE BIESPECÍFICO GPA33 X CD3 QUE TIENE UN DOMINIO FC DE IGG (DART-2 C/FC) EN MONOS CYNOMOLGUS.

La capacidad de los dominios VL_{CD3} y VH_{CD3} de los diacuerpos de la presente invención para unirse al CD3 de mono cynomolgus permite el uso de tales animales para medir la farmacocinética *in vivo* de los diacuerpos de la presente invención.

Para medir tal farmacocinética, se inyectó el diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (DART-2) o el diacuerpo monovalente biespecífico gpA33 x CD3 que tiene un dominio Fc de IgG (DART-2 c/Fc versión 1), descriptos anteriormente, en monos cynomolgus (10 µg/kg/día) y se monitoreó la concentración de tales moléculas remanecientes en la circulación. La **Figura 13** muestra el resultado de este estudio, e indica que DART DART-2 y DART-2 c/Fc versión 1 mostraron una cinética de eliminación de primer orden.

Ejemplo 10

ANÁLISIS SPR DE LA UNIÓN DEL DIACUERPO FC MONOVALENTE BIESPECÍFICO GPA33 X CD3 (DART-1 C/FC VERSIÓN 1) A CD3 Y GPA33 HUMANOS Y DE MONO CYNOMOLGUS

Se analizó la unión del diacuerpo Fc monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (DART-1 c/Fc versión 1) a versiones solubles del receptor humano y de mono cynomolgus, por SPR y en un biosensor BIAcore 3000 (GE, Healthcare). Se inmovilizaron los receptores en el chip del sensor CM5, de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante. Se activaron brevemente los grupos carboxilo en la superficie del chip del sensor con la inyección de una solución que contenía 0,2 M de N-etil-N-(3dietilamino-propil) carbodiimida y 0,05 M de N-hidroxi-succinimida. A continuación, se inyectó el receptor CD3 soluble (1µg/ml) sobre la superficie activada

de CM5 en 10 mM de acetato de sodio, pH 5,0, a una velocidad de flujo de 5 µL/min, seguido de 1 M de etanolamina para su desactivación.

Las versiones solubles de CD3 humano y de cynomolgus empleadas en ese análisis se expresaron en células de mamíferos como un heterodímero CD3ε / CD3δ, estabilizado por secuencias enrolladas E y K promotoras de heterodímeros de carga opuesta, en su extremo C-terminal. El CD3ε soluble de cynomolgus contenía los primeros 118 residuos de aminoácidos del CD3ε de mono cynomolgus, con el alelo V35 (FN18+) seguido por el dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**), anteriormente descrito, en el extremo carboxi. La secuencia de aminoácidos del alelo V35 (FN18+) de CD3ε de cynomolgus es (**SEQ ID NO:49**):

MQSGTRWRVL	GLCLLSIGVW	GQDGNEEMGS	ITQTPYQVSI
SGTTVILTCS	QHLGSEAQWQ	HNGKNKEDSG	DRLFLPEFSE
MEQSGYYVCY	PRGSNPEDAS	HHLYLKARVC	ENCMEMDVMA
VATIVIVDIC	ITLGLLLLVY	YWSKNRKAKA	KPVTRGAGAG
PIRKGQQDLY	SGLNQRRRI	GRQRGQNKER	PPPVPNPDIYE

El CD3δ soluble de cynomolgus contenía los primeros 101 residuos de aminoácidos del CD3δ de mono cynomolgus, seguido por el dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**), anteriormente descrito, en el extremo carboxi. La secuencia de aminoácidos del CD3δ de cynomolgus es (**SEQ ID NO:50**):

MEHSTFLSGL	VLATLLSQVS	PFKIPVEELE	DRVFVKCNTS
VTWVEGTVGT	LLTNNTRLDL	GKRILDPRGI	YRCNGTDIYK
DKESAVQVHY	RMCQNCVELD	PATLAGIIVT	DVIATLLLLAL
GVFCFAGHET	GRLSGAADTQ	ALLRNDQVYQ	PLRDRDDAQY
SRLGGNWARN	K		

Las dos proteínas se coexpresaron en células CHO-S de mamífero y se purificaron usando un mAb anti enrollado E/K acoplado a SEPHAROSE®.

El CD3ε humano soluble contenía los residuos 1-127 de aminoácidos de CD3ε humano, con los alelos C119S y C122S,

seguidos por el dominio enrollado E (**SEQ ID NO:3**), anteriormente descrito, en el extremo carboxi. La secuencia de aminoácidos del CD3ε humano es (**SEQ ID NO:51**):

```

      MQSGTHWRVL      GLCLLSVGWV      GQDGNEEMGG      ITQTPYKVSI
SGTTVILTCP      QYPGSEILWQ      HNDKNIGGDE      DDKNIGSDED      HLSSLKEFSEL
EQSGYYVCYP      RGSKPEDANF      YLYLRARVCE      NCMEMDVMSV      ATIVIVDICI
TGGLLLLIVYY      WSKNRKAKAK      PVTRGAGAGG      RQRGQNKERP      PPVPNPDIYEP
IRKGQRDLYS      GLNQRRRI

```

El CD3δ humano soluble contenía los residuos 1-101 del CD3δ humano, seguidos por el dominio enrollado K (**SEQ ID NO:4**), anteriormente descrito, en el extremo carboxi. Las dos proteínas se coexpresaron en células CHO-S de mamífero y se purificaron usando una columna de afinidad anti enrollado E/K. La secuencia de aminoácidos del CD3δ humano es (**SEQ ID NO:52**):

```

      FKIPIEELE      DRVFNCSNTS      ITWVEGTVGT      LLSDITRLDL
GKRILDPRGI      YRCNGTDIYK      DKESTVQVHY      RMCQSCVELD      PATVAGIIVT
DVIATLLLAL      GVFCFAGHET      GRLSGAADTQ      ALLRNDQVYQ      PLRDRDDAQY
SHLGGNWARN      K

```

El gpA33 humano soluble contenía los residuos 1-235 del gpA33 humano con repeticiones de la (**SEQ ID NO:53**) HHHHHH ("6His") en el extremo terminal carboxi. El gpA33 soluble de cynomolgus contenía los residuos 1-314 del gpA33 de mono cynomolgus (Met 1 a Gln 314) con repeticiones de 6His en el extremo terminal carboxi. Las dos proteínas se coexpresaron en células CHO-S de mamífero y se purificaron usando Ni SEPHAROSE®.

Los experimentos de unión se realizaron en tampón HBS-EP, que contiene 10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA y 0,005 % de tensioactivo P20. La unión de DART-2 c/Fc versión 1 se analizó (por duplicado) a concentraciones de 0, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 nM, inyectados durante 120 segundos a una velocidad de flujo de 30 l/min.

La regeneración de las superficies de los receptores inmovilizados se hizo mediante inyección de pulsos de 10 mM de glicina, pH 1,5. Se trazaron curvas de referencia por inyección de cada dilución de DART-2 c/Fc sobre la superficie tratada sin ninguna proteína inmovilizada. Las curvas de unión a concentración cero se restaron como blanco. Se determinaron los valores de K_d mediante un ajuste global de las curvas de unión a las del modelo de unión 1:1 de Langmuir (software BIAevaluation™ v4.1).

El análisis SPR de la unión del diacuerpo Fc monovalente biespecífico gpA33 x CD3 (DART-2 c/Fc versión 1) a CD3 y gpA33 humanos y de mono cynomolgus demostró una sustancial similitud entre las dos especies (**Figuras 14A-14B; Figuras 15A-15B**). La **Tabla 8** recoge las constantes de de disociación del equilibrio (K_D) calculadas por ajuste global a un modelo 1:1 de Langmuir de las constantes de afinidad y cinéticas de las interacciones con DART-2 c/Fc. Los valores de K_D de DART-2 c/Fc versión 1 del CD3 humano y de mono cynomolgus y son casi idénticos, de 23 y 26 nM, respectivamente, a pesar de algunas diferencias en las respuestas máximas de unión entre los dos antígenos. La orientación aleatoria de los antígenos con diferentes secuencias de aminoácidos directamente inmovilizadas en la superficie puede dar lugar a diferentes densidades de sitios de unión disponibles en la superficie. Los valores de K_D para la interacción de DART-2 c/Fc versión 1 con gpA33 humano y de mono son 2,2 nM y 12 nM, respectivamente (**Tabla 8**). La diferencia en la afinidad es el resultado de una disminución relativamente pequeña en la constante de velocidad de asociación y de aumento de la constante de velocidad de disociación en la interacción de DART-2 c/Fc versión 1 con gpA33 de mono cynomolgus (**Tabla 8**). Los datos son promedios

de tres experimentos independientes en duplicado (SD = desviación estándar; h, humano; cyno, mono cynomolgus).

Tabla 8

Constantes de disociación del equilibrio (KD) para la unión de DART-2 c/Fc versión 1 con antígenos de especies diferentes

Antígenos	k_a ($\pm$SD) ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d ($\pm$SD) (s^{-1})	K_D ($\pm$SD) (nM)
hCD3 ϵ / δ	1,5 ($\pm$ 0,1) $\times 10^5$	3,5 ($\pm$ 0.06) $\times 10^{-3}$	23 $\pm$ 2,0
cynoCD3 ϵ / δ	1,3 ($\pm$ 0,02) $\times 10^5$	3,4 ($\pm$ 0,02) $\times 10^{-3}$	26 $\pm$ 0,6
hgpA33-His	4,2 ($\pm$ 0,3) $\times 10^5$	9,0 ($\pm$ 0,5) $\times 10^{-4}$	2,2 $\pm$ 0,2
cynogpA33-His	2,3 ($\pm$ 0,2) $\times 10^5$	2,8 ($\pm$ 0,1) $\times 10^{-3}$	12 $\pm$ 1,0

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la presente memoria se incorporan a la misma a modo de referencia, en la misma medida como si se indicara específica e individualmente que cada solicitud de patente o publicación individual se adjunta en su totalidad, a modo de referencia. Aunque la invención se ha descrito en conexión con implementaciones específicas, se entenderá que es capaz de modificaciones y esta solicitud pretende cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente divulgación derivadas de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y que puedan aplicarse a las características esenciales indicadas anteriormente.