

P-15758

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2018/0009112**Solicitud de patente a nombre de **AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad **AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH**, domiciliada en Munich, Alemania, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al Oficio No. 7025 notificado mediante notificación electrónica el 10 de mayo de 2021, relacionado con el primer concepto técnico de fondo, y para el cual solicité oportunamente prórroga el 03 de agosto de 2021, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Modificación al capítulo reivindicatorio

Con fundamento en la facultad que confiere el Artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de once (11) reivindicaciones y reemplaza completamente el capítulo presentado anteriormente.

En particular, en el nuevo pliego reivindicatorio se han realizado los siguientes cambios:

- 1.1.** El objeto de la nueva reivindicación 1 corresponde al objeto de las anteriores reivindicaciones 1 y 4, 5 y 6, y se basa además en la descripción tal como se presentó originalmente. En el nuevo pliego reivindicatorio se especifican los enlazadores entre los dominios y dentro del tercer dominio por su secuencia, y se especifica el antígeno de superficie de la célula diana como un antígeno seleccionado del grupo que consiste de CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFRvIII, CD33, **CD19**, CD30 y CD70. Además, se especifica que el primer y el segundo dominio están en formato scFc.

- 1.2. Se modificó la redacción del preámbulo de la nueva reivindicación 1 como sigue "construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla con vida media prolongada".
- 1.3. Con el propósito de darle continuidad al trámite de la solicitud, se ha eliminado el término "al menos".
- 1.4. El objeto de las nuevas reivindicaciones 2 y 3 corresponde al objeto de las antiguas reivindicaciones 2 y 3, y el objeto de las nuevas reivindicaciones 4 a 11 al objeto de las antiguas reivindicaciones 7 a 14.
- 1.5. En la nueva reivindicación 10, se eliminó la referencia al proceso de reclamado a fin de darle continuidad al trámite de la solicitud.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la solicitud original, por lo que es posible afirmar que el nuevo pliego reivindicatorio se ajusta a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486/00.

2. Modificación al título

Con el propósito de adecuar el título de la solicitud de patente al nuevo pliego reivindicatorio, se modifica el título de la solicitud como se lee a continuación:

"CONSTRUCTOS DE ANTICUERPO BIESPECÍFICOS DE CADENA SENCILLA (SCFV) CON VIDA MEDIA PROLONGADA QUE SE UNEN A CÉLULAS T"

3. Pago de tasas

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta pago por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene un número de cláusulas menor que el presentado anteriormente.

Asimismo, considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones, se anexa el comprobante de pago correspondiente a la tasa de modificación a las reivindicaciones, según lo establecido en la Resolución No. 59669 de 2020.

En caso de considerar necesario un nuevo examen a fin establecer la patentabilidad de la materia del nuevo pliego reivindicatorio, rogamos notificarnos al respecto a fin de proceder a realizar el pago correspondiente.

4. Claridad y sustento de las nuevas reivindicaciones

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones, de modo tal que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención descrita, a la vez que cuentan con el debido sustento en la descripción de la solicitud. No obstante, a continuación se presentan algunas aclaraciones con respecto a las observaciones realizadas por el examinador en su concepto técnico.

En particular, se hace notar que en vista de las modificaciones realizadas al pliego reivindicatorio, tal como fueron comentadas en la sección 1 del presente memorial, mediante las cuales se define la materia de nueva reivindicación 1 en términos de las secuencias de los enlazadores, el formato de los dominios, y las modificaciones realizadas a la redacción de la reivindicación, es posible manifestar que la materia objeto de la nueva reivindicación 1 y las reivindicaciones dependientes que hacen referencia a la nueva reivindicación 1 es clara y comprende todas las características que el examinador considera esenciales.

Por lo tanto, es posible afirmar que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad a la invención descrita, a la vez que cuentan con el debido sustento en la descripción de la solicitud, cumpliendo así con los requisitos estipulados en el Artículo 30 de la Decisión 486.

5. Suficiencia de la descripción

El examinador objeta que la especificación no divulga la invención de manera suficientemente completa para que la persona normalmente versada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla (o reproducirla). En particular, el examinador considera que la descripción

"divulga específicamente constructos de anticuerpo biespecíficos, con vida media extendida, caracterizados por el formato scFv-scFv-scFc. Este se encuentra conformado por "tres" dominios en un orden amino a carboxilo, en donde: un primer dominio se une a un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste en CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFRvIII, CD33, CD19, CD30, y CD70; un segundo dominio se une a un epítipo

extracelular de la cadena CD3ε de humano y/o de Macaca; y un tercer dominio que comprende dos monómeros polipeptídicos, cada uno con una bisagra, un dominio CH2 y uno CH3, en donde estos están fusionados entre sí mediante un enlazador peptídico. Dicho tercer dominio comprende el formato bisagra-CH2-CH3-enlazador-bisagra-CH2-CH3, además, el sitio de glicosilación en la posición 314 de Kabat de los dominios CH2 se elimina mediante una sustitución N314G. Las mencionadas moléculas demostraron la inactivación de linfocitos T independientes del antígeno tumoral diana, mientras que los constructos de anticuerpo que prolongan la vida media, tales como heteroFc y X-Body indujeron una fuerte regulación positiva de CD69+ en la superficie celular de las linfocitos T en ausencia de células diana (Ejemplo1, Fig. 3)."

Al respecto, se hace notar que, que si bien disentimos de la opinión del examinador, las modificaciones introducidas en el pliego reivindicatorio en esta oportunidad redirigen la solicitud a un constructo de anticuerpo tal como el que fue reconocido por el examinador en su oficio técnico. Por tanto, se hace notar que a partir de la información divulgada en la descripción de la presente solicitud, una persona del oficio normalmente versada en la materia estaría en capacidad de llevar a cabo el vector reivindicado, cumpliendo así con el requerimiento del Artículo 28, literal e, de la Decisión 486.

6. Nivel inventivo

El examinador establece en su concepto técnico que la altura inventiva del constructo de anticuerpo biespecífico, según lo reclamado en la antigua reivindicación 1, estaría afectada por las enseñanzas del documento **WO2014/114800**, titulado "Antibody constructs for CDH 19 and CD3" (**D1**), en combinación con las enseñanzas del documento **US20080260738**, titulado "Single chain fc, methods of making and methods of treatment" (**D3**), siendo el documento **D1** considerado como el arte previo más cercano a la invención.

En particular, el examinador señala que la diferencia entre la invención definida en la reivindicación 1 y el constructo de anticuerpo multiespecífico divulgado por el documento **D1** consiste en que el constructo de anticuerpo de la solicitud contiene adicionalmente en su extremo C-terminal un tercer dominio que comprende dos monómeros polipeptídicos, cada uno con una bisagra, un dominio CH2 y uno CH3, los cuales están fusionados entre sí mediante un enlazador peptídico. Además, el dominio CH2 de la presente solicitud presenta la sustitución N314G.

Sin embargo, el examinador manifiesta que no es posible evidenciar un efecto técnico asociado a dichas diferencias, puesto que considera la reivindicación independiente no

define el constructo de anticuerpo biespecífico en términos de sus características técnicas esenciales estructurales y funcionales completas.

En este sentido, hacemos notar que el artículo 18 de la Decisión 486/00 determina que *"una invención tiene nivel inventivo, si para una **persona del oficio normalmente versada en la materia técnica** correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica". (El subrayado es nuestro).*

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

Considerando la definición anterior, a continuación, se procede a destacar las diferencias entre la invención de la presente solicitud, y el arte previo divulgados en los documentos **D1** y **D3**, mostrando cómo dichas diferencias le proporcionan un efecto técnico inesperado que no podría haber sido derivado de manera obvia a partir de las enseñanzas del arte previo citado por el examinador, para así evidenciar la no obviedad de la invención reclamada por mi mandante.

Como primera medida se hace notar que, únicamente con el propósito de darle continuidad al trámite de la presente solicitud, la reivindicación 1 han sido modificada para incluir todas las características técnicas señaladas como esenciales por el examinador en su oficio técnico.

Si bien el documento **D1** divulga un constructo de anticuerpo multiespecífico aislado que comprende un primer dominio de unión capaz de unirse a CDH 19 humana en la superficie de una célula diana y un segundo dominio capaz de unirse a CD3 humano en la superficie de una célula T, el documento **D1** no proporciona ninguna sugerencia acerca de dónde y cómo modificar dicha molécula para obtener una molécula con vida media prolongada como la reclamada por la presente solicitud. Por consiguiente, la persona del oficio normalmente versada en la materia técnica no habría tenido ninguna motivación para combinar la enseñanza del documento **D1** con las del documento **D3** que, entre otras cosas, se refiere al uso de dominios Fc.

El documento **D1** NO sugiere que los dominios Fc puedan usarse para prolongar la vida media, sino solo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En particular, el documento **D1** en la página 40, líneas 36 a la página 41, líneas 5 enseña:

"En este formato, el constructo de anticuerpos es un constructo de anticuerpos tri o multifuncional que se dirige a las células plasmáticas mediante la unión a CDH19, mediando la actividad de las linfocitos T citotóxicas a través de la unión de CD3 y proporcionando una función adicional, como un dominio constante de Fc completamente funcional que media citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos a través del reclutamiento de células efectoras como células NK, un marcador (fluorescente, etc.), un agente terapéutico como, por ejemplo, una toxina o radionúclido, y/o un medio para mejorar la vida media en suero, etc. "

Por lo tanto, el documento **D1** no proporciona ninguna sugerencia de un punto de partida para combinarlo con las enseñanzas del documento **D3**.

El documento **D3** se encuentra dirigido a moléculas de Fc de cadena sencilla (scFc). En una realización particular, el documento **D3** describe, en el párrafo 170, un anticuerpo biespecífico con un scFc. Sin embargo, la única divulgación del documento **D3** de un biscFv con un scFc, en el párrafo 170, enseña únicamente que dicho anticuerpo biespecífico comprende un scFv en el extremo N-terminal de un scFc y otro scFv en el C-terminal del Fc único. El documento **D3** no enseña ni sugiere un constructo de anticuerpo como el la nueva reivindicación 1, es decir, en el que ambos scFv están ubicados en el extremo N-terminal del scFc. En otras palabras, el documento **D3** aparentemente solo describe un constructo scFv-scFc-scFv. De hecho, el documento **D3**, en el párrafo 170, recita específicamente lo siguiente:

*"En otras realizaciones, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención **comprende un scFv en el extremo N de un Fc de cadena sencilla y otro en el extremo C del Fc simple** (un "biscFv-scFc "). En algunas variaciones, el N el scFv terminal se fusiona directamente a la bisagra Fc y con un enlazador corto o largo en el terminal C que se conecta al segundo scFv. Estos enlazadores son normalmente enlazadores Gly-Ser". (Énfasis añadido).*

De hecho, la única descripción del documento **D3** sobre un anticuerpo biespecífico con un scFc es la enseñanza de que el scFc debe ubicarse en el medio de los scFv terminales. No hay ninguna enseñanza o sugerencia por parte del documento **D3** de que el scFc deba ubicarse en el extremo C-terminal, o en el extremo N-terminal para el caso, de un anticuerpo biespecífico.

Por al menos esta razón, el documento **D3** incluso en combinación con el documento **D1** no puede enseñar la materia objeto de la nueva reivindicación 1. Por tanto, una persona del oficio normalmente versada en la materia, en vista de las enseñanzas de los documentos el documento **D1** y **D3**, no habría llegado al constructo actualmente reivindicado.

6.1 Con respecto al efecto técnico inesperado de la invención reclamada

Como se estableció anteriormente, el constructo de anticuerpo de la reivindicación 1, a diferencia de **D3**, requiere un orden específico de los tres dominios, en el que tanto scFv, es decir, el dominio de unión a CD33 y el dominio de unión a la cadena CD3e, son adyacentes entre sí en el N-terminal del constructo, y la modalidad Fc reside en el C-terminal del constructo.

El solicitante desea llamar la atención del examinador nuevamente sobre la característica del orden de los dominios, es decir, que el primer, segundo y tercer dominio están dispuestos en un orden de amino a carboxilo. La diferencia en el efecto técnico resultante es significativa y el arreglo de dominios que reclama la presente solicitud no es arbitrario, sino beneficioso, como se indica en la solicitud tal como fue presentada originalmente y además está soportado por los datos complementarios proporcionados en el **Anexo A** adjunto al presente memorial.

Los datos del **Anexo A** muestran que los valores de afinidad de un constructo de anticuerpo que comprende el formato de dominios reclamado en las presentes reivindicaciones no difieren significativamente de los valores de afinidad de un constructo de anticuerpo con una disposición de dominios alternativa (correspondiente al primer, tercer y segundo dominio en orden amino a carboxilo). Consulte la Figura 1 del **Anexo A**. Sin embargo, en marcado contraste, los valores de la actividad citotóxica difieren significativamente entre los dos formatos. Como es de conocimiento para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica, la afinidad es el primer aspecto que se investiga y se considera típicamente en el desarrollo de un constructo de anticuerpo porque la afinidad es un determinante de la acción deseada. Sin embargo, sorprendentemente, la afinidad comparable **NO** se tradujo en una actividad citotóxica comparable que se ha probado en cinco líneas celulares diferentes para constructos anti-CD33.

El constructo de anticuerpo reivindicado comprende un formato de dominios que es superior en términos de citotoxicidad deseada para la diana que no se encuentra

sugerido en el estado de la técnica citado por el examinador ni resulta obvia al comparar los valores de afinidad de los formatos respectivos, que los documentos del arte previo combinados tampoco sugiere. Por lo tanto, el constructo de anticuerpo reivindicado comprende un concepto inventivo y no obvio que se encuentra sustentado por un efecto técnico sorprendente resultante de la posición de los dominios en el constructo de anticuerpo biespecífico como se reivindica en la presente solicitud.

Este orden específico de los dominios dentro del constructo de anticuerpos reivindicado proporciona al constructo la capacidad de unirse tanto a CD33 en una célula tumoral como a CD3 en un linfocito T citotóxico, lo que permite que la molécula BiTE® forme un puente entre el linfocito T citotóxico y el tumor y permitir que el linfocito T reconozca la célula tumoral y la combata a través de una infusión de moléculas tóxicas. Debido a que el documento **D3** no enseña un constructo que comprenda la misma organización de dominios de unión, la molécula del documento **D3** no funcionará de la misma manera que el constructo de anticuerpo de la reivindicación 1. Al menos por esta razón, el objeto reivindicado proporciona resultados inesperados y una mejora con respecto al arte previo citado por el examinador.

Aún más, la persona del oficio normalmente versada en la materia no habría combinado las enseñanzas de **D1** con las del documento **D3**. Mientras que el documento **D3** enseña polipéptidos scFc, **D1** es completamente silencioso sobre las moléculas Fc monocatenarias.

La divulgación del documento **D3** se aleja del objeto de la nueva reivindicación 1. El documento **D3** enseña polipéptidos scFc que presentan una función efectora similar a un anticuerpo y/o una vida media sérica prolongada (véase **D3**, en la página 6, [0046]). Una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica que lea el documento **D3** tomaría al documento **D3** no solo como punto de partida para obtener una molécula con una semivida sérica prolongada, sino también o alternativamente, para obtener una molécula que muestre funciones efectoras similares a anticuerpos con respecto a la porción scFc. Sin embargo, esto último es evitado en el constructo de anticuerpo de la reivindicación 1.

El constructo de anticuerpo monocatenario biespecífico según la nueva reivindicación 1 requiere específicamente que el constructo tenga una vida media prolongada y que el sitio de glicosilación en la posición 314 de Kabat de los dominios CH2 en el tercer dominio del constructo de anticuerpo se elimine mediante una sustitución N314X. La extensión de la vida media la proporciona el tercer dominio que, por ejemplo, aumenta

significativamente el tamaño y el peso molecular del constructo de anticuerpo biespecífico en su conjunto. El intercambio de aminoácidos en los dominios CH2 del tercer dominio, es decir, en la posición 314 según la numeración de Kabat, preferiblemente reduce o evita la activación inespecífica de linfocitos T o la activación del complemento. La persona del oficio normalmente versada en la materia conoce que el esquema de numeración de Kabat es un estándar ampliamente adoptado para numerar los residuos en un anticuerpo de una manera coherente. Sin querer vincularse a la teoría, el intercambio de aminoácidos N314X elimina un sitio de glicosilación en el dominio scFc (véase el párrafo [72] en la página 24, líneas 4-7 de la solicitud PCT/EP2017/052212 como fue publicada; véase el párrafo que conecta las páginas 27 y 28 de la descripción presentada con el radicado NC2018/0009112). Como resultado, ya no se puede unir azúcar allí, lo que se requiere para la unión de un dominio Fc al receptor Fc que está, por ejemplo, ubicado en un linfocito T. Mediante dicha mutación, la unión del constructo de anticuerpo reivindicado por la presente solicitud a través de su dominio scFc a un receptor Fc se reduce o suprime significativamente. Por tanto, en marcado contraste con las enseñanzas del documento **D3**, el constructo de anticuerpos de la presente solicitud preferiblemente no muestra funciones efectoras mediadas por Fc similares a anticuerpos, como la activación de linfocitos T inespecíficas (véase la página 2, párrafo [4]) y página 29, párrafo [86] de la solicitud PCT/EP2017/052212 como fue publicada).

Con el fin de demostrar que el efecto asociado con la característica discutida para la materia objeto de la reivindicación 1, según ha sido modificada en esta oportunidad, se encuentra soportada para todas las diana moleculares divulgada, se llama la atención del examinador respetuosamente al Ejemplo 1 y la Figura 3 de la solicitud como fue presentada originalmente. El ejemplo 1 se refiere a la determinación de la expresión de CD69 en linfocitos T CD4+ y CD8+ por citometría de flujo y mAb específicos de antígeno conjugados. Como se explica allí, la activación de linfocitos T independiente de la diana en términos de regulación positiva de CD69 se observó para varios constructos biespecíficos probados en estos ensayos, pero no (o significativamente menos) en el constructo de anticuerpo scFc reivindicado, en la que el sitio de glicosilación en la posición 314 de Kabat de cada uno de los dominios CH2 en el tercer dominio se elimina mediante una sustitución N314X, y en el que X es cualquier aminoácido excluyendo Q. La regulación positiva de CD69 fue en general más pronunciada para los constructos canónicas de anticuerpos BiTE®, heteroFc y moléculas cruzadas en comparación con los constructos de anticuerpos reivindicados que comprenden un scFc como tercer dominio.

Por tanto, el objeto de la nueva reivindicación 1 y las reivindicaciones dependientes es inventivo a la luz de las enseñanzas contenidas en los documentos **D1** y **D3**. En consecuencia, también se cumple el requisito de unidad.

Así, teniendo en cuenta todos los argumentos aquí proporcionados y las modificaciones realizadas al pliego reivindicatorio en esta oportunidad, es posible afirmar que de la que la invención de las nuevas reivindicaciones 1 a 11, representa un avance técnico con respecto a la norma técnica conocida al momento de la presentación de la presente solicitud, cumpliendo así con el requerimiento del Artículo 18 de la Decisión 486/00.

7. Conclusiones

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

- i) Las modificaciones aquí presentadas cumplen con las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486;
- ii) La descripción de la presente solicitud incluye una descripción de la mejor manera conocida por el solicitante para ejecutar o llevar a la práctica la invención, utilizando ejemplos y referencias a los dibujos, de ser éstos pertinentes; y,
- iii) Las reivindicaciones de la presente solicitud son claras y cuentan con debido sustento en el capítulo descriptivos, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 30 de la Decisión 486;
- iv) La invención de la presente solicitud no hubiese resultado obvia para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica, ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica, cumpliendo así con el requerimiento del Artículo 18 de la Decisión 486;

Así, respetuosamente se solicita al examinador reconocer la novedad, el nivel inventivo y la aplicación industrial para la invención titulada "*CONSTRUCTOS DE ANTICUERPO BIESPECÍFICOS DE CADENA SENCILLA (SCFV) CON VIDA MEDIA PROLONGADA QUE SE UNEN A CÉLULAS T*" a nombre de AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH y, por lo tanto, conceder el privilegio de patente, si los cumpliera; o si el señor examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos comunicarnos los

debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación del Artículo 42 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo que señala que: "*Habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión, que será motivada. La decisión resolverá todas las peticiones que hayan sido oportunamente planteadas dentro de la actuación por el peticionario y por los terceros reconocidos*", (el subrayado es nuestro).

8. Anexos

- 8.1** Nuevo capítulo reivindicatorio que incluye once (**11**) reivindicaciones.
- 8.2** Anexo A
- 8.3** Recibo de pago por concepto de modificación voluntaria al pliego reivindicatorio.

Señora Directora,


CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

REIVINDICACIONES

1. Un constructo de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla con vida media prolongada, caracterizado porque comprende tres dominios en un orden de amino a carboxilo, en el que:
 - un primer dominio que tiene una formato de fragmento variable de cadena sencilla (scFv) se une a un antígeno de superficie de una célula diana, en el que el antígeno de la superficie de la célula diana es un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste de CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFRvIII, CD33, CD19, CD20 y CD70;
 - un segundo dominio que tiene una formato scFv se une a un epítipo extracelular de la cadena CD3ε de humano y/o de *Macaca*, en el que un enlazador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-3 enlaza el primer y segundo dominio; y
 - un tercer dominio, en el que un péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11 y 12 enlaza el segundo y el tercer dominio, cuyo tercer dominio comprende dos monómeros polipeptídicos, cada uno comprendiendo una bisagra, un dominio CH2 y uno CH3, en el que dichos dos monómeros polipeptídicos están fusionados entre sí mediante un enlazador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 8, en el que dicho tercer dominio comprende en un orden amino a carboxilo:

bisagra-CH2-CH3-enlazador-bisagra-CH2-CH3,

en el que el sitio de glicosilación en la posición 314 de Kabat de los dominios CH2 en el tercer dominio del constructo de anticuerpo se elimina mediante una sustitución N314G, en el que el dominio CH2 comprende un puente disulfuro de cisteína intradominio y en el que el constructo de anticuerpo preferiblemente no muestra inespecífica activación de células T.
2. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque cada uno de dichos monómeros polipeptídicos tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 17-24.

3. El constructo de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque
 - (i) el primer dominio comprende dos dominios variables de anticuerpo y el segundo dominio comprende dos dominios variables de anticuerpo;
 - (ii) el primer dominio comprende un dominio variable de anticuerpo y el segundo dominio comprende dos dominios variables de anticuerpo;
 - (iii) el primer dominio comprende dos dominios variables de anticuerpo y el segundo dominio comprende un dominio variable de anticuerpo; o
 - (iv) el primer dominio comprende un dominio variable de anticuerpo y el segundo dominio comprende un dominio variable de anticuerpo.

4. El constructo de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el constructo de anticuerpo comprende en un orden desde el extremo amino al extremo carboxilo:
 - (a) el primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 52, 70, 58, 76, 88, 106, 124, 94, 112, 130, 142, 160, 178, 148, 166, 184, 196, 214, 232, 202, 220, 238, 250, 266, 282, 298, 255, 271, 287, 303, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 466, 482, 498, 514, 530, 546, 327, 343, 359, 375, 391, 407, 423, 439, 455, 471, 487, 503, 519, 353, 551, 592, 608, 624, 640, 656, 672, 688, 704, 720, 736, 752, 768, 784, 800, 816, 832, 848, 864, 880, 896, 912, 928, 944, 960, 976, 992, 1008, 1024, 1040, 1056, 1072, 1088, 1104, 1120, 1136, 1152, 1168, 1184, 597, 613, 629, 645, 661, 677, 693, 709, 725, 741, 757, 773, 789, 805, 821, 837, 853, 869, 885, 901, 917, 933, 949, 965, 981, 997, 1013, 1029, 1045, 1061, 1077, 1093, 1109, 1125, 1141, 1157, 1173, 1189, 1277, 1289, 1301, 1313, 1325, 1337, 1349, 1361, 1373, 1385, 1397, 1409, 1421, 1433, 1445;
 - (b) un enlazador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-3;
 - (c) el segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79,

- 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 o 187 de WO 2008/119567 o en SEQ ID NO: 15;
- (d) un enlazador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 9, 10, 11 y 12;
 - (e) el primer monómero polipeptídico del tercer dominio que tiene una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 17-24;
 - (f) un enlazador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 5, 6, 7 y 8; y
 - (g) el segundo monómero polipeptídico del tercer dominio que tiene una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 17-24.

5. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) SEQ ID NOs: 54, 55, 60, y 61;
- (b) SEQ ID NOs: 72, 73, 78, y 79;
- (c) SEQ ID NOs: 90, 91, 96, 97, 108, 109, 114, y 115;
- (d) SEQ ID NOs: 144, 145, 150, 151, 162, 163, 168, 169, 180, 181, 186, y 187;
- (e) SEQ ID NOs: 198, 199, 204, 205, 216, 217, 222, 223, 234, 235, 240, y 241;
- (f) SEQ ID NOs: 252, 306, 257, 307, 268, 308, 273, 309, 284, 310, 289, 311, 300, 312, 305, y 313;
- (g) SEQ ID NOs: 324, 554, 329, 555, 340, 556, 345, 557, 356, 558, 361, 559, 372, 560, 377, 561, 388, 562, 393, 563, 404, 564, 409, 565, 420, 566, 425, 567, 436, 568, 441, 569, 452, 570, 457, 571, 468, 572, 473, 573, 484, 574, 489, 575, 500, 576, 505, 577, 516, 578, 521, 579, 532, 580, 537, 581, 548, 582, 553, y 583;
- (h) SEQ ID NOs: 594, 610, 626, 642, 658, 674, 690, 706, 722, 738, 754, 77, 786, 802, 818, 834, 850, 866, 882, 898, 914, 930, 946, 962, 978, 994, 1010, 1026, 1042, 1058, 1074, 1090, 1106, 1122, 1138, 1154, 1170,

1186, 599, 615, 631, 647, 663, 679, 695, 711, 727, 743, 759, 775, 791, 807, 823, 839, 855, 871, 887, 903, 919, 935, 951, 967, 983, 999, 1015, 1031, 1047, 1063, 1079, 1095, 1111, 1127, 1143, 1159, 1175, 1191, y 1192-1267;

(i) SEQ ID NO: 43; y

(j) SEQ ID Nos: 1279, 1280, 1291, 1292, 1303, 1304, 1315, 1316, 1327, 1328, 1339, 1340, 1351, 1352, 1363, 1364, 1375, 1376, 1387, 1388, 1399, 1400, 1411, 1412, 1423, 1424, 1435, 1436, 1447, 1448.

- 6.** Un polinucleótido caracterizado porque codifica un constructo de anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 7.** Un vector caracterizado porque comprende un polinucleótido como se define en la reivindicación 6.
- 8.** Una célula hospedadora caracterizado porque esta transformada o transfectada con el polinucleótido como se define en la reivindicación 6 o con el vector como se define en la reivindicación 7.
- 9.** Un proceso para la producción de un constructo de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dicho proceso comprende cultivar una célula hospedadora como se define en la reivindicación 8 bajo condiciones que permiten la expresión del constructo de anticuerpo como se define en las reivindicaciones 1 a 5 y recuperar el constructo de anticuerpo producido a partir del cultivo.
- 10.** Una composición farmacéutica caracterizado porque comprende un constructo de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 11.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque es estable durante al menos cuatro semanas a -20°C.

ANEXO A

Objetivo:

Es un objetivo del presente estudio mostrar que un constructo de anticuerpo biespecífico que comprende (i) un dominio de unión a la diana como primer dominio, (ii) un dominio de unión a CD3 como el segundo dominio, y (iii) un dominio scFc como tercer dominio en la orientación de amino a carboxilo que tiene características diferentes con respecto a un constructo de anticuerpo biespecífico que comprende otro orden de dominios como el scFc entre el dominio de unión a la diana y el dominio de unión a CD3. Esto debe ejemplificarse basándose en dos constructos de anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la presente invención que se dirigen a CD33 (SEQ ID NO 42), CD70 (SEQ ID NO 706) y sus respectivas contrapartes con un orden diferente de dominios.

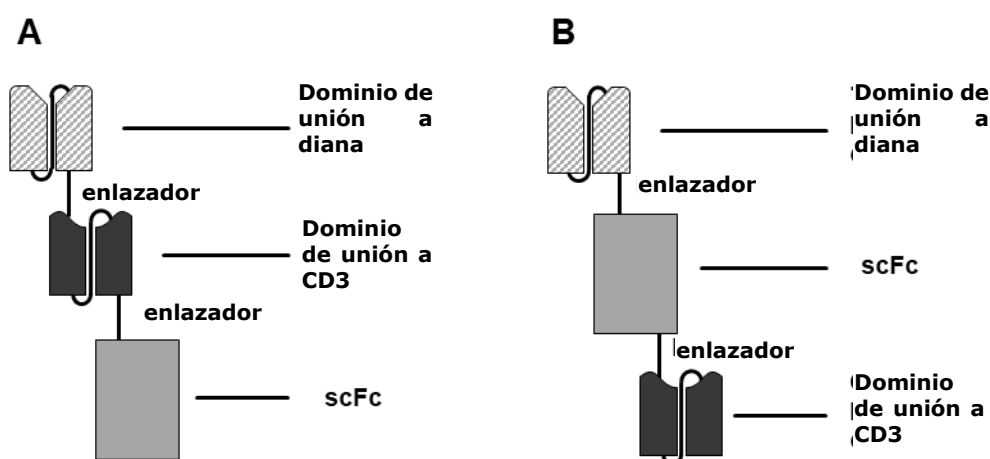


Figura 1: Visualización de los dos formatos distintivos (con respecto al orden de dominio) de los constructos de anticuerpos biespecíficos que se compararán a continuación: scFv-scFv-scFc (A, constructo según la reivindicación 1) frente a scFv-scFc-scFv (B, aparentemente sugerido, por ejemplo, por D3)

Material y métodos.

Análisis de unión basado en citometría de flujo de constructos de anticuerpos biespecíficos en líneas de células diana.

Se examinó el análisis de unión de los constructos de anticuerpos biespecíficos a sus dianas, respectivamente expresado en una superficie celular, mediante análisis de citometría de flujo. Por lo tanto, las células que expresan la diana o HPB-ALL, una línea celular de leucemia de linfocitos T humanas, se incubaron en una solución 50 nM/0,5 nM de las respectivas constructos de anticuerpos biespecíficos en tampón FACS (PBS de Dulbecco (Gibco) con suero fetal bovino al 2%), los controles negativos

se resuspendieron solo en tampón FACS. Después de una incubación de 60 minutos a 4 °C, las células se lavaron y se detectaron los constructos de anticuerpos biespecíficos con un anticuerpo secundario contra IgG humana marcado con PE. Después de una incubación de 30 minutos a 4 °C, se lavaron las células dos veces, se resuspendieron en tampón que incluía una tinción para células muertas y se midieron mediante citometría de flujo en un instrumento iQue Plus (Intellicyt, ahora Sartorius). La unión a células negativas con tinción de células muertas se analizó con FlowJo.

Ensayo de citotoxicidad basado en FACS con PBMC humanas no estimuladas Aislamiento de células efectoras.

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll a partir de preparaciones de linfocitos enriquecidos (capas leucocíticas), un producto secundario de los bancos de sangre que recogen sangre para transfusiones. Las capas leucocíticas fueron suministradas por un banco de sangre local y se prepararon PBMCs el día después de la extracción de sangre. Después de centrifugación por densidad de Ficoll y lavados extensos con PBS de Dulbecco (Gibco), se eliminaron los eritrocitos restantes de los PBMCs mediante incubación con tampón de lisis de eritrocitos (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM, EDTA 100 μM). Los linfocitos restantes comprenden principalmente linfocitos B y T, células NK y monocitos. Los PBMCs se mantuvieron en cultivo a 37 °C/ CO_2 al 5% en medio RPMI (Gibco) con FBS al 10% (Bio West, #S1810).

Aislamiento de linfocitos T humanas.

Para el aislamiento de linfocitos T humanas, se utilizó el kit de aislamiento de células Pan T, humano (Miltenyi Biotec, MACS, #130-096-535) para eliminar las células no diana, es decir, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, células B, células madre, células dendríticas, células NK, granulocitos o células eritroides de la solución de células PBMCs. Las células se aislaron de acuerdo con el protocolo del fabricante y posteriormente se resuspendieron en medio completo RPMI, es decir, RPMI1640 (Biochrom AG, # FG1215) suplementado con 10% de FBS (Bio West, # S1810), 1x aminoácidos no esenciales (Biochrom AG, # K0293), Piruvato de sodio 1 mM (Biochrom AG, # L0473) y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Biochrom AG, # A2213) y se incubaron a 37 °C hasta que se necesitó.

Marcado de células diana para el ensayo de citotoxicidad celular dependiente de linfocitos T (TDCC) basado en citometría de flujo.

Para el análisis de lisis celular en ensayos de citometría de flujo, se usó el colorante de membrana fluorescente DiOC18 (DiO) (Thermo Fisher, #V22886) para marcar células CHO humanas transfectadas con diana o líneas celulares cancerosas como células diana y distinguirlas de las células efectoras. Brevemente, las células se recolectaron, se lavaron una vez con PBS y se ajustaron a 1×10^6 células/ml en PBS que contenía el colorante de membrana DiO ($5 \mu\text{l}/10^6$ células). Después de la incubación durante 2 min a temperatura ambiente, las células se lavaron dos veces en medio RPMI completo y se usaron directamente en el ensayo.

Configuración del ensayo y análisis de citotoxicidad celular dependiente de linfocitos T (TDCC) basado en citometría de flujo.

La actividad citotóxica de los constructos de anticuerpos biespecíficos se determinó mediante la capacidad de inducir la lisis de células diana mediada por linfocitos T. Por lo tanto, se analizó la lisis de células diana humanas en presencia de diluciones seriadas de constructos de anticuerpos biespecíficos y células efectoras.

Las células diana marcadas con DiO y las células efectoras (es decir, células Pan T) se mezclaron en una relación efectora a célula diana (E:T) de 10:1 y se incubaron con diluciones en serie del constructo de anticuerpo biespecífico correspondiente en placas de 96 pozos. Las placas se incubaron a 37°C , 5% de CO_2 y 95% de humedad relativa durante 48 h. El día del análisis del ensayo, las células se transfirieron a una nueva placa de 96 pozos y se controló la pérdida de la integridad de la membrana de la célula diana mediante la adición de yoduro de propidio (PI) a una concentración final de $1 \mu\text{g}/\text{ml}$. El PI es un colorante impermeable a la membrana que normalmente se excluye de las células viables, mientras que las células muertas lo absorben y se vuelven identificables por emisión fluorescente.

Las muestras se midieron mediante citometría de flujo en un instrumento iQue Plus (Intellicyt, ahora Sartorius) y se analizaron con el software Forecyt (Intellicyt). Las células diana se identificaron como células positivas para DiO. Las células diana PI negativas se clasificaron como células diana vivas. El porcentaje de citotoxicidad respectiva de lisis celular específica se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Citotoxicidad [\%]} = \left(\frac{n_{\text{células diana muertas}}}{n_{\text{células diana}}} \right) \times 100$$

n = número de eventos por pocillo

Utilizando el software GraphPad Prism 7.04 (Graph Pad Software, San Diego), se representó gráficamente el porcentaje de citotoxicidad frente a las concentraciones de constructo de anticuerpos biespecíficos correspondientes. Se analizaron las curvas de respuesta a la dosis sigmoidea con los cuatro modelos de regresión logística paramétrica con pendiente variable y se calcularon los valores de CE_{50} .

Líneas celulares usadas.

Se utilizaron las siguientes líneas celulares de cáncer humano para el análisis de unión y el análisis de citotoxicidad:

- **HPB-ALL (solo análisis de unión)**
- **EOL-1**
- **NOMO-1**
- **KG-1**
- **NB-4**
- **MOLM-13**

Ejemplo 1: Comparación de scFv-scFv-scFc frente a scFv-scFc-scFv.

Análisis de unión de constructos de anticuerpos biespecíficos en líneas celulares mediante citometría de flujo.

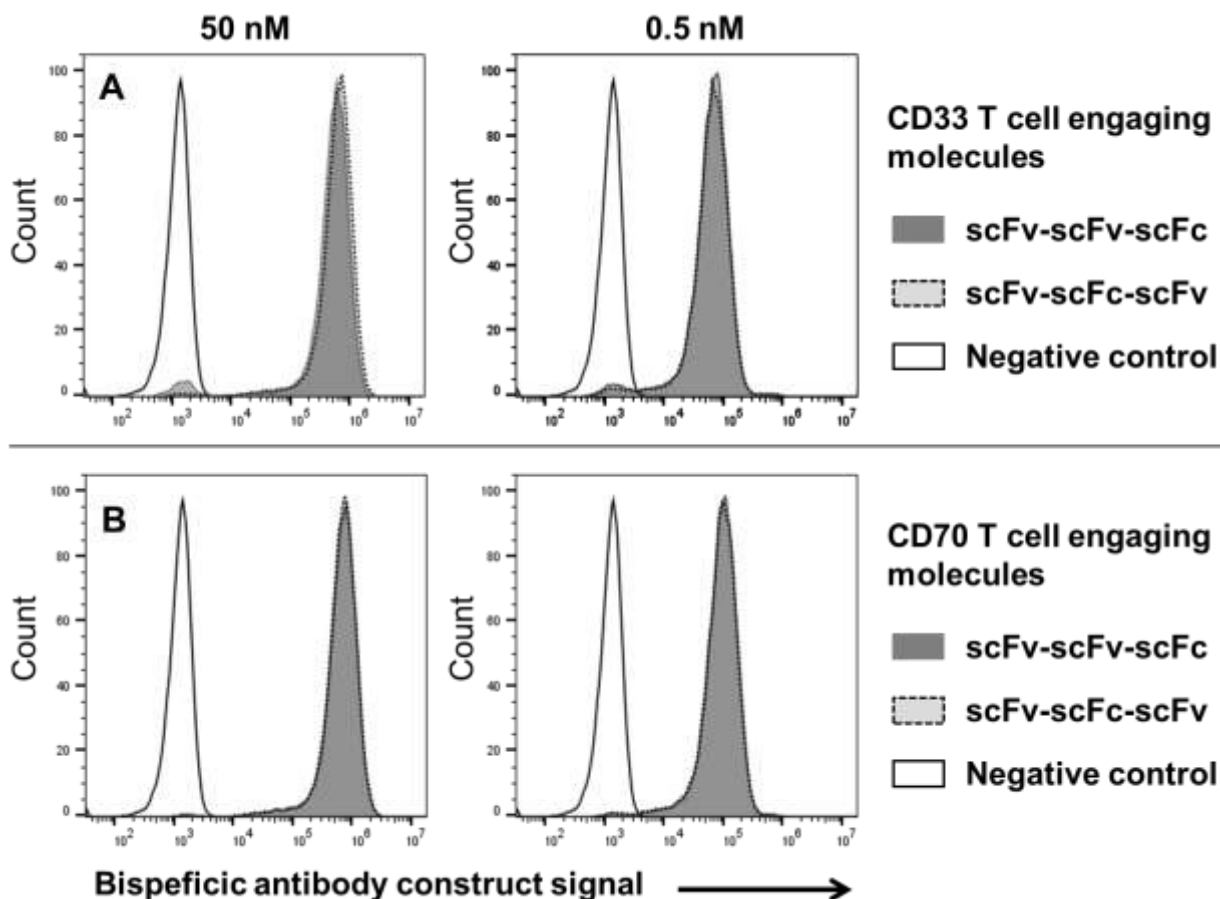
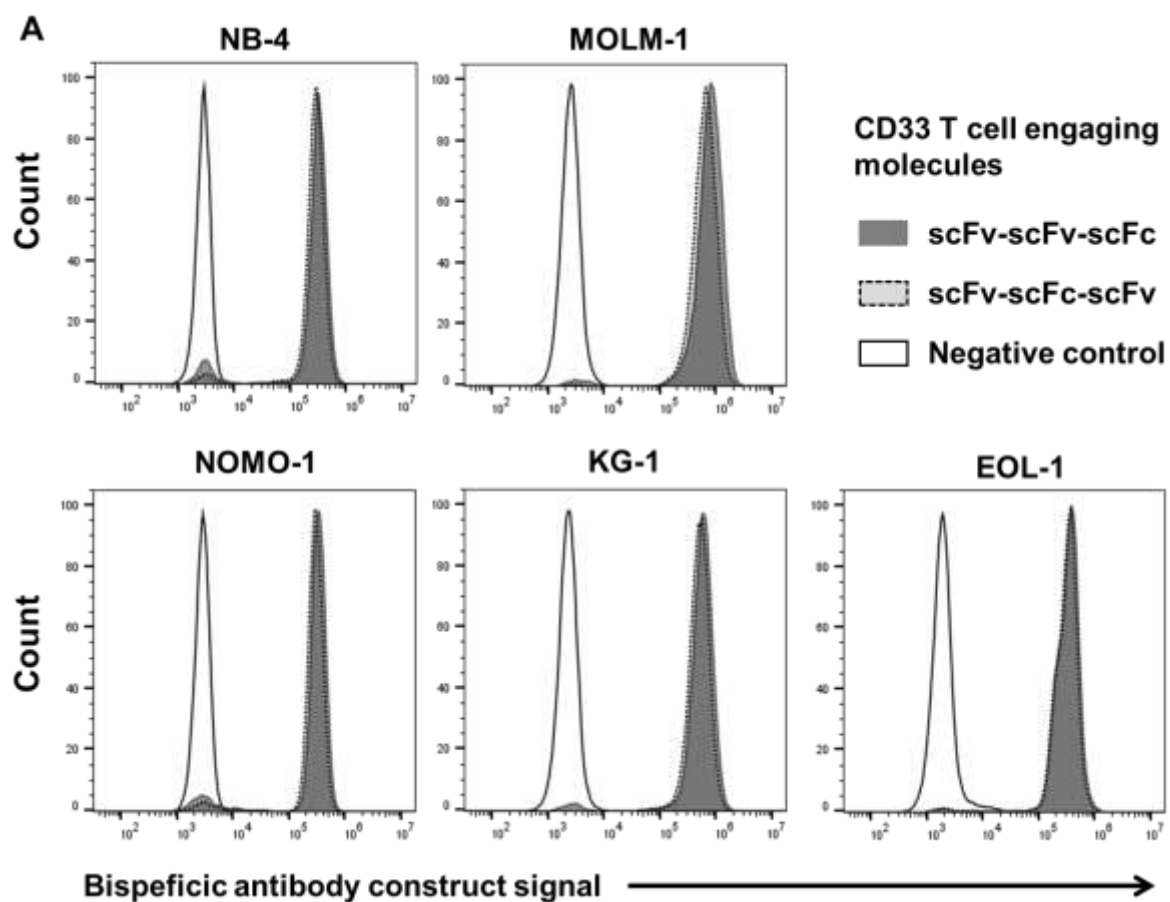


Figura 2: Análisis de unión de constructos de anticuerpos biespecíficos a la línea celular HPB-ALL que expresan CD3 mediante citometría de flujo.

A: Unión a CD3 por moléculas de acoplamiento a linfocitos T CD33 en formato scFv-scFv-scFc (gris oscuro) frente al formato scFv-scFc-scFv (gris claro, línea de puntos) a 50 nM y 0,5 nM contra control negativo (línea continua, sin relleno) . **B:** Unión a CD3 por moléculas de acoplamiento a linfocitos T CD70 en formato scFv-scFv-scFc frente a formato scFv-scFc-scFv a 50 nM y 0,5 nM frente a control negativo.



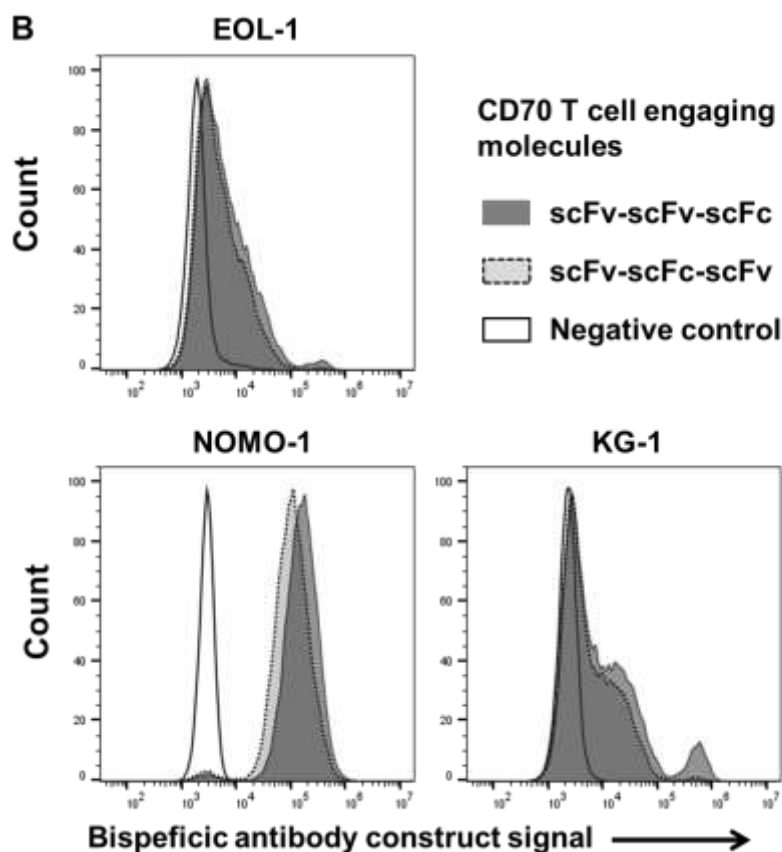


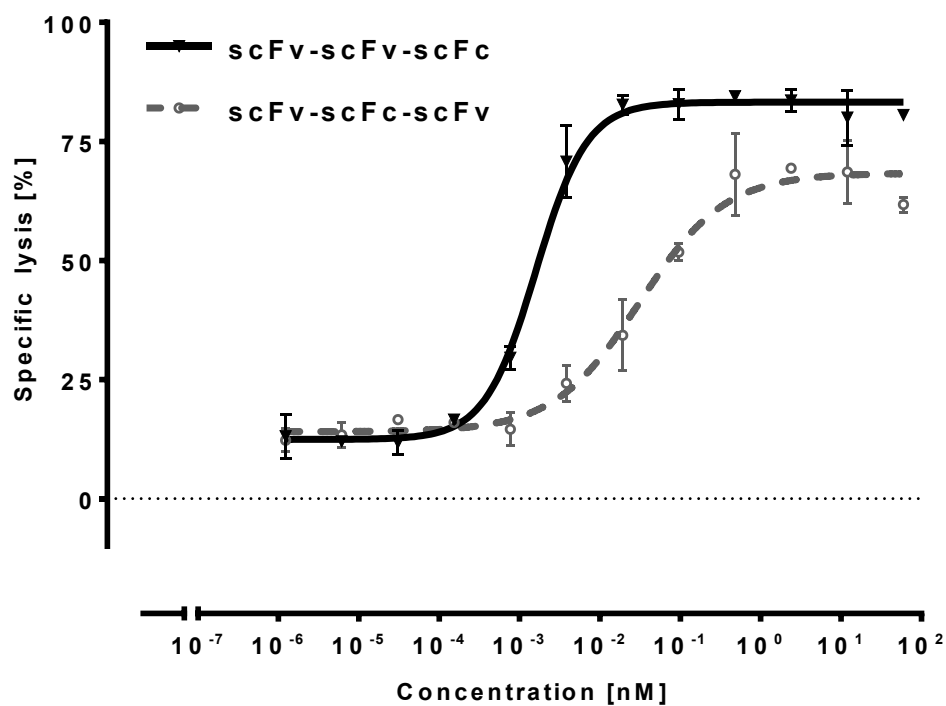
Figura 3: Análisis de unión de constructos de anticuerpos biespecíficos en líneas de células cancerosas que expresan diana mediante citometría de flujo. A: Curvas de unión de moléculas que reconocen linfocitos T CD33 en formato scFv-scFv-scFc (gris oscuro) frente al formato scFv-scFc-scFv (gris claro con línea de puntos) a 50 nM en EOL-1, NOMO-1, KG-1, Líneas celulares NB-4 y MOLM-13 contra control negativo (línea continua, sin relleno). B: Curvas de unión de moléculas que reconocen linfocitos T CD70 en formato scFv-scFv-scFc frente al formato scFv-scFc-scFv a 50 nM en líneas celulares EOL-1, NOMO-1 y KG-1 contra control negativo.

Resultados: En el análisis de citometría de flujo, las curvas de moléculas que reconocen linfocitos T CD33 en formato scFv-scFv-scFc y formato scFv-scFc-scFv se superponen casi completamente en todas las líneas celulares probadas en todas las concentraciones. Esto significa que los aglutinantes en los dos formatos mostraron una capacidad de unión comparable a CD3, así como una capacidad de unión comparable a CD33 en las líneas de células cancerosas probadas (Fig. 2). Las moléculas que reconocen linfocitos T CD70 en formato scFv-scFv-scFc y formato scFv-scFc-scFv mostraron la misma capacidad de unión a CD3 como se ve por una superposición completa de las curvas en el gráfico de citometría de flujo. Además, los aglutinantes diana en los dos formatos probados mostraron una capacidad de

unión comparable a CD70 en líneas de células cancerosas, mostrando el formato scFv-scFc-scFc una unión ligeramente menor que el formato scFv-scFv-scFc (Fig. 3).

Fig. 4 A-D: actividad citotóxica de constructos de anticuerpos biespecíficos en líneas de células cancerosas.

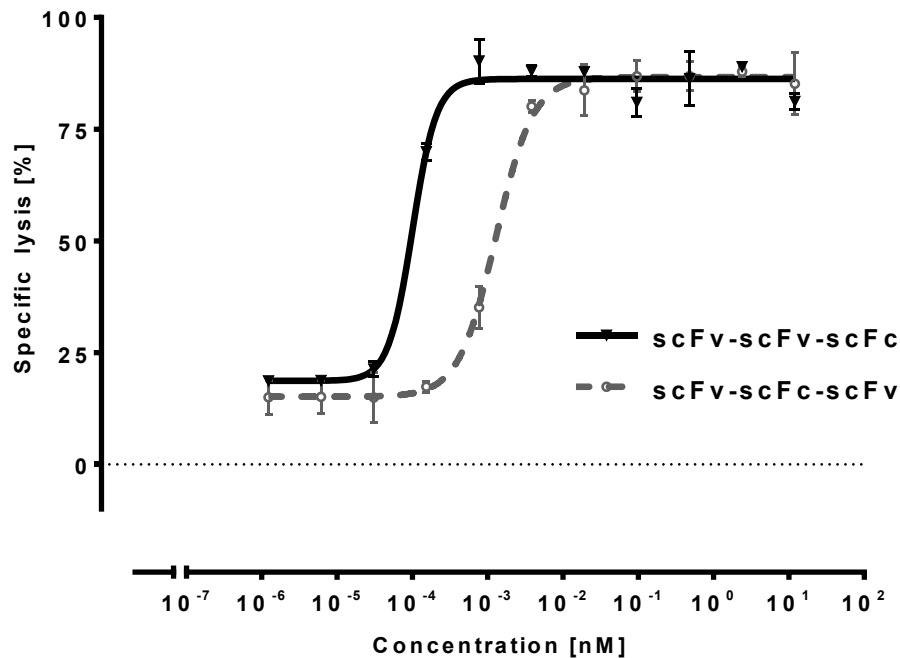
Cytotoxic activity of CD33 T cell engaging molecules on EOL-1



A

	Formato	EOL-1 CE ₅₀ [pM]	Brecha entre formatos
Molécula 1 que reconoce linfocitos T CD33	scFv-scFv-scFc	1,6	19
Molécula 2 que reconoce linfocitos T CD33	scFv-scFc-scFv	31,3	

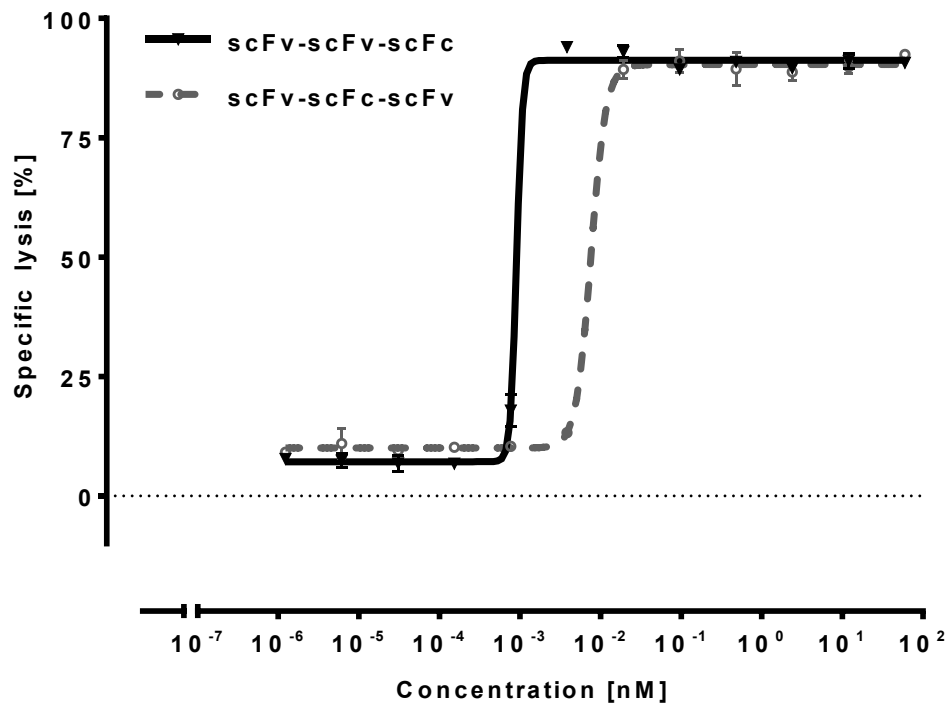
Cytotoxic activity of CD33 T cell engaging molecules on KG-1



B

	Formato	KG-1 CE ₅₀ [pM]	Brecha entre formatos
Molécula 1 que reconoce linfocitos T CD33	scFv-scFv-scFc	0,1	13
Molécula 2 que reconoce linfocitos T CD33	scFv-scFc-scFv	1.3	

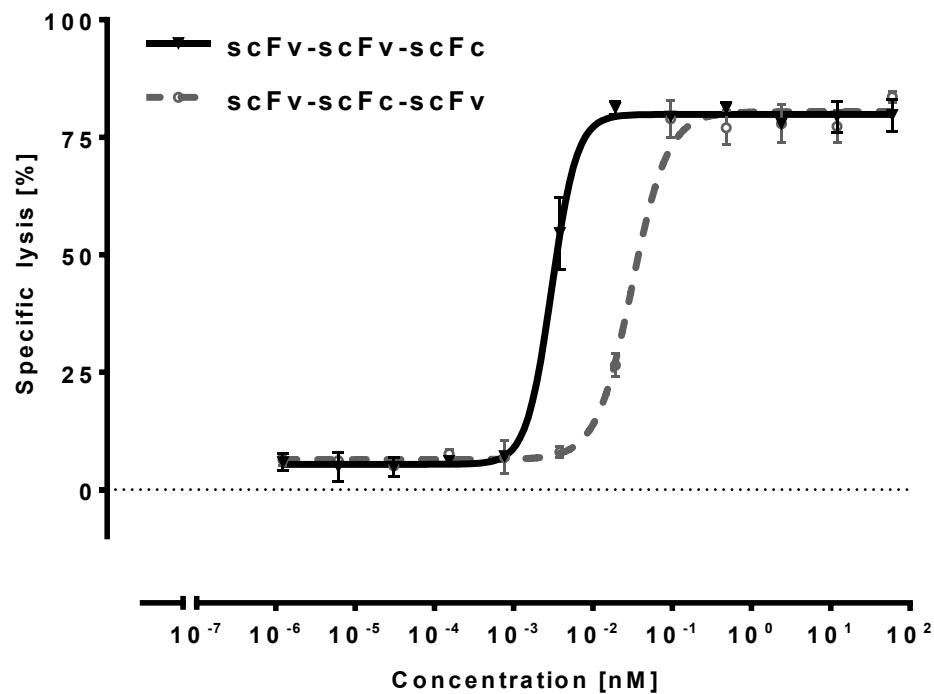
Cytotoxic activity of CD33 T cell engaging molecules
on NB-4



C

	Formato	NB-4 CE ₅₀ [pM]	Brecha entre formatos
Molécula 1 que reconoce linfocitos T CD33	scFv-scFv-scFc	0,9	8
Molécula 2 que reconoce linfocitos T CD33	scFv-scFc-scFv	7,6	

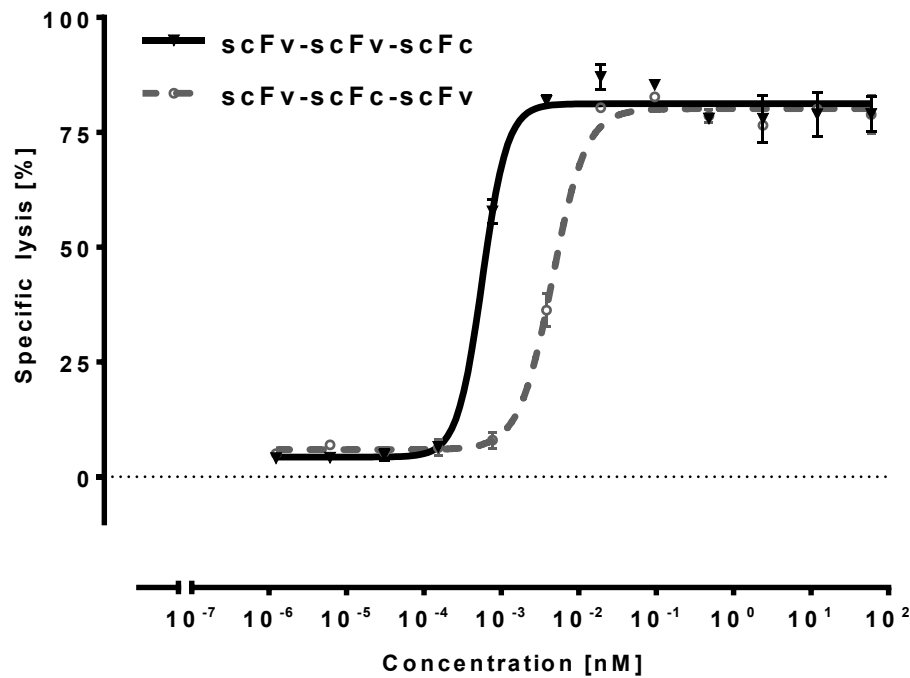
Cytotoxic activity of CD33 T cell engaging molecules
on NOMO-1



D

	Formato	NOMO-1 CE ₅₀ [pM]	Brecha entre formatos
Molécula 1 que reconoce linfocitos T CD33	scFv-scFv-scFc	3,0	10
Molécula 2 que reconoce linfocitos T CD33	scFv-scFc-scFv	31,3	

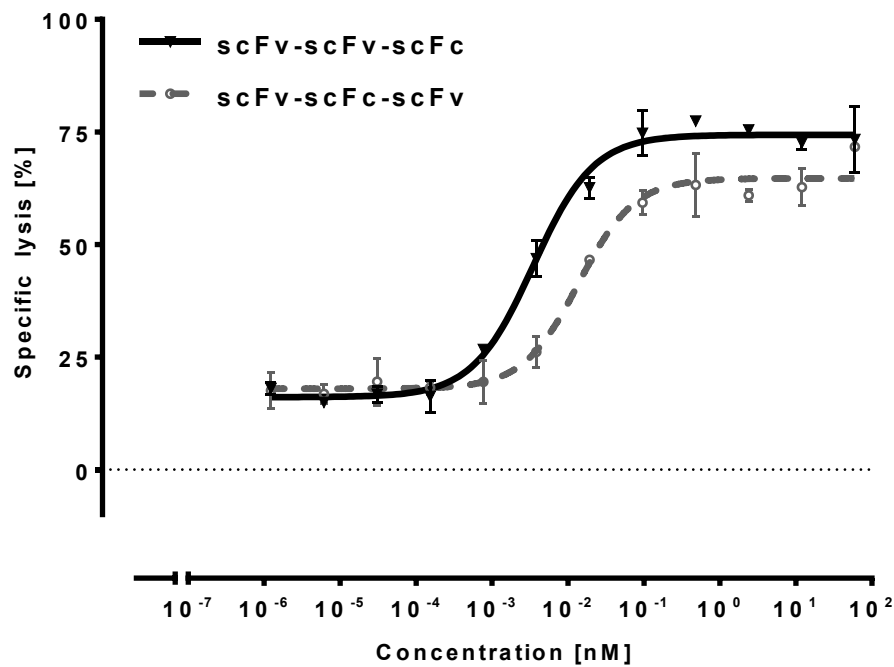
Cytotoxic activity of CD33 T cell engaging molecules
on MOLM-13



E

	Formato	MOLM-13 CE ₅₀ [pM]	Brecha entre formatos
Molécula 1 que reconoce linfocitos T CD33	scFv-scFv-scFc	0,6	8
Molécula 2 que reconoce linfocitos T CD33	scFv-scFc-scFv	4,6	

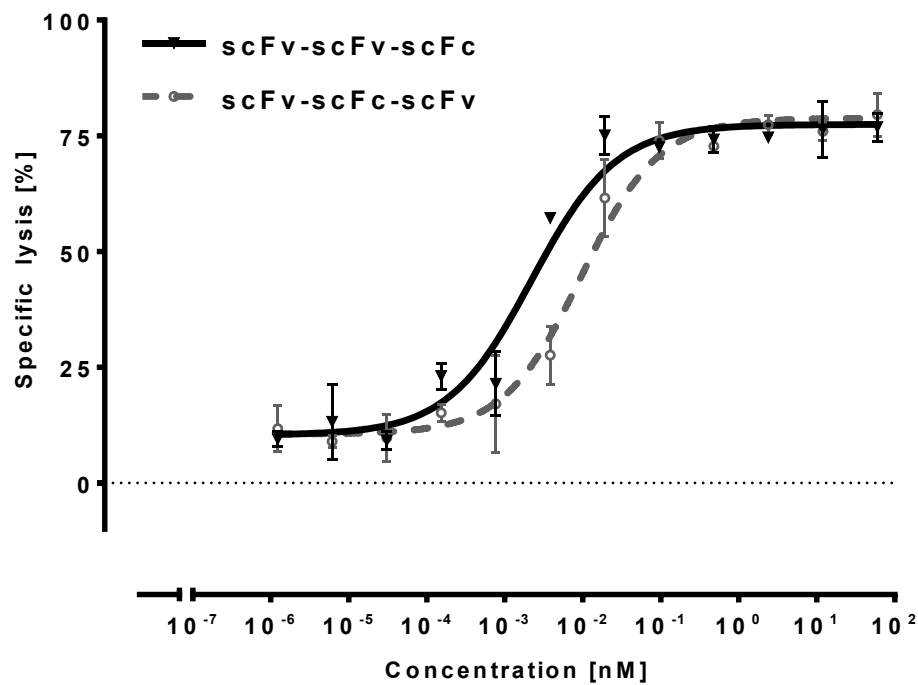
Cytotoxic activity of CD70 T cell engaging molecules
on EOL-1



F

	Formato	EOL-1 CE50 [pM]	Brecha entre formatos
Molécula 1 que reconoce linfocitos T CD70	scFv-scFv-scFc	3,5	4
Molécula 2 que reconoce linfocitos T CD70	scFv-scFc-scFv	13,7	

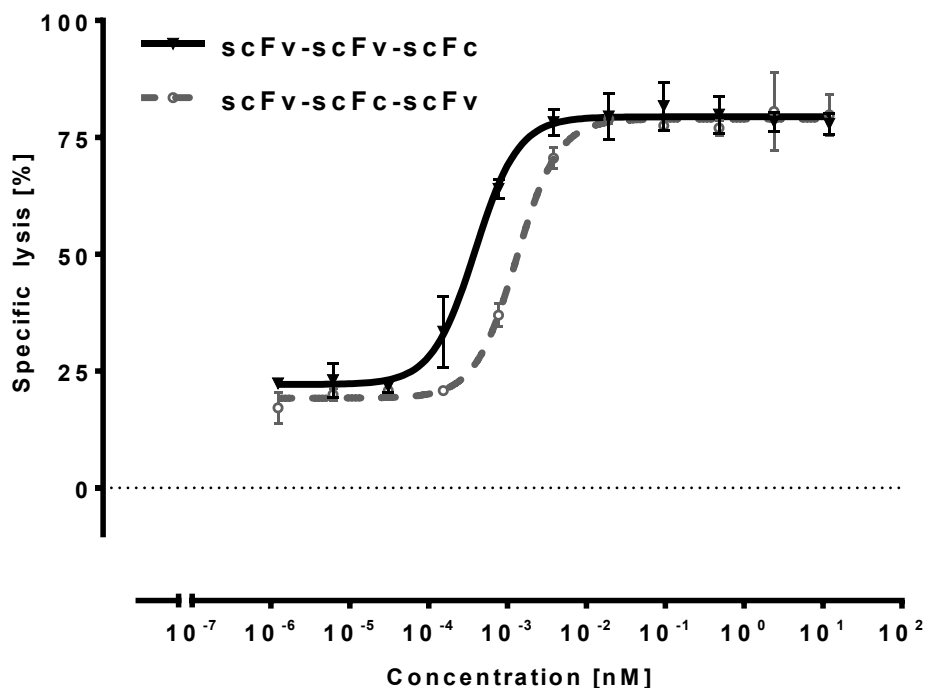
Cytotoxic activity of CD70 T cell engaging molecules
on NOMO-1



G

	Formato	NOMO-1 CE50 [pM]	Brecha entre formatos
Molécula 1 que reconoce linfocitos T CD70	scFv-scFv-scFc	2.2	4
Molécula 2 que reconoce linfocitos T CD70	scFv-scFc-scFv	9,6	

Cytotoxic activity of CD70 T cell engaging molecules on KG-1



H

	Formato	KG-1 CE ₅₀ [pM]	Brecha entre formatos
Molécula 1 que reconoce linfocitos T CD70	scFv-scFv-scFc	0,4	4
Molécula 2 que reconoce linfocitos T CD70	scFv-scFc-scFv	1,4	

Figura 4 A-H: Curvas de citotoxicidad y valores de CE₅₀ de constructos de anticuerpos biespecíficos en líneas celulares que expresan la molécula diana (Figuras 4 A-E de CD33 y Figuras F-H de CD70). Las células efectoras eran linfocitos T Pan no estimuladas.

Resultados: La molécula 1 que reconoce linfocitos T CD33 (SEQ ID NO: 42) mostró una mayor actividad (valor de CE₅₀ más bajo) en las cinco líneas de células cancerosas positivas para CD33 analizadas que la molécula 2 que reconoce linfocitos T CD33, que varía en una mejora de 8 hasta de 19 veces. La molécula 1 que reconoce linfocitos T CD33 tiene la disposición de dominio dominio de unión a la diana x dominio de unión a CD3 x scFc (scFv-scFv-scFc), mientras que la molécula 2 que

reconoce linfocitos T CD33 tiene la disposición de dominio dominio de unión a la diana x scFc x dominio de unión a CD3 (scFv-scFc-scFv). En las tres líneas celulares de cáncer humano CD70 positivas probadas, la molécula 1 que reconoce linfocitos T CD70 mostró una actividad citotóxica hasta 4 veces mayor en comparación con la molécula 2 que reconoce linfocitos T CD70. La molécula 1 que reconoce linfocitos T CD70 tiene la disposición de dominio dominio de unión al objetivo x Dominio de unión a CD3 x scFc (scFv-scFv-scFc), mientras que la molécula 2 de unión a linfocitos T CD70 tiene la disposición de dominio dominio de unión a diana x scFc x dominio de unión a CD3 (scFv-scFc-scFv). En todos los ajustes de diana probados y en diferentes líneas celulares, la actividad citotóxica del formato scFv-scFv-scFc fue superior al formato scFv-scFc-scFv. Esto es especialmente sorprendente, ya que la capacidad de unión de las diferentes constructos de anticuerpos biespecíficos a CD3 y CD33 respectivamente CD70, como se muestra en el análisis de citometría de flujo, fue comparable entre los formatos. Esta superioridad se puede observar en células diana con alta y baja expresión de la diana molecular (ver tabla 1).

Moléculas de superficie por célula (media)	CD33	CD70
NOMO-1	22 499	27 700
MOLM-13	63 787	Dakota del Norte
KG-1	29 118	9 155
NB-4	24 358	Dakota del Norte
EOL-1	28 005	1 991

Tabla 1: Moléculas de superficie por célula cuantificadas mediante QifiKit (número medio determinado por al menos dos experimentos). nd: no determinado

Leyenda

Molécula 1 que reconoce linfocitos T CD33

CD33 E11 CC x I2C x scFc (SEQ ID NO: 42)

Molécula 2 que reconoce linfocitos T CD33

CD33 E11 CC x scFc x I2C

Molécula 1 que reconoce linfocitos T CD70

CD70 1-C7D CC x I2C x scFc (SEC ID N.º: 706)

Molécula 2 que reconoce linfocitos T CD70

CD70 1-C7D CC x scFc x I2C



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2018/0009112
Recibo: 21-96968
Fecha: 20/09/2021

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 582815
CUS: 1136459518

Patente PCT
CONSTRUCTOS DE ANTICUERPO BIESPECÍFICOS QUE SE LIGAN A CÉLULAS T

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 169,680	\$ 169,680
TOTAL					\$ 169,680