

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 935 062**

(51) Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2015** PCT/US2015/051314

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016** WO16048938

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2015** E 15844698 (9)

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2022** EP 3197917

---

(54) Título: **Diacuerpos monovalentes biespecíficos que son capaces de unirse a CD19 y CD3 y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

**26.09.2014 US 201462055695 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.03.2023**

(73) Titular/es:

**MACROGENICS, INC. (100.0%)**  
9704 Medical Center Drive  
Rockville, MD 20850, US

(72) Inventor/es:

**JOHNSON, LESLIE, S.;**  
**BONVINI, EZIO;**  
**LAM, CHIA-YING, KAO;**  
**MOORE, PAUL, A.;**  
**LIU, LIQIN y**  
**KOENIG, SCOTT**

(74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 935 062 T3**

---

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Diacuerpos monovalentes biespecíficos que son capaces de unirse a CD19 y CD3 y usos de los mismos

5 **Campo de la invención:**

La presente descripción se dirige a diacuerpos monovalentes biespecíficos que comprenden dos cadenas polipeptídicas y que poseen un sitio de unión específico para un epítopo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítopo de CD3 (es decir, un "diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3"). Lo más preferentemente, tales diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 están compuestos por tres cadenas polipeptídicas y poseen un sitio de unión específico para un epítopo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítopo de CD3 y comprenden adicionalmente un dominio Fc de inmunoglobulina (es decir, un "diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3"). Los diacuerpos monovalentes biespecíficos y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente descripción son capaces de unirse simultáneamente a CD19 y CD3. También se describen composiciones farmacéuticas que contienen tales diacuerpos monovalentes biespecíficos o tales diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos. También se describen métodos para el uso de dichos diacuerpos en el tratamiento de enfermedades, en particular, en neoplasias hematológicas.

20 **Antecedentes de la invención:**

A. CD19

CD19 (antígeno de superficie de linfocitos B B4, número de registro de GenBank M28170) es una glicoproteína transmembrana de tipo I de 95 kDa de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Stamenkovic, I. *et al.* (1988) "CD19, The Earliest Differentiation Antigen Of The B Cell Lineage, Bears Three Extracellular Immunoglobulin-Like Domains And An Epstein-Barr Virus-Related Cytoplasmic Tail", *J. Exper. Med.* 168(3): 1205-1210; Tedder, T.F. *et al.* (1989) "Isolation Of cDNAs Encoding The CD19 Antigen Of Human And Mouse B Lymphocytes. A New Member Of The Immunoglobulin Superfamily", *J. Immunol.* 143(2):712-717; Zhou, L.J. *et al.* (1991) "Structure And Domain Organization Of The CD19 Antigen Of Human, Mouse, And Guinea Pig B Lymphocytes. Conservation Of The Extensive Cytoplasmic Domain", *J. Immunol.* 147(4):1424-1432). CD19 se expresa en las células dendríticas foliculares y en todos los linfocitos B desde los primeros prelinfocitos B en el momento del reordenamiento de la cadena pesada hasta la etapa de células plasmáticas, cuando la expresión de CD19 se regula negativamente. CD19 no se expresa en células madre hematopoyéticas o en linfocitos B antes de la etapa de prelinfocitos B (Sato *et al.* (1995) "The CD19 Signal Transduction Molecule Is A Response Regulator Of B-Lymphocyte Differentiation", *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 92:11558-62; Loken *et al.* (1987) "Flow Cytometric Analysis of Human Bone Marrow. II. Normal B Lymphocyte Development", *Blood*, 70:13161324; Wang *et al.* (2012) "CD19: A Biomarker For B Cell Development, Lymphoma Diagnosis And Therapy", *Exp. Hematol. and Oncol.* 1:36).

CD19 es un componente del complejo receptor de linfocitos B (BCR, por sus siglas en inglés) y es un regulador positivo de la señalización de linfocitos B que modula el umbral para la activación de los linfocitos B y la inmunidad humoral. CD19 interactúa con CD21 (CR2, receptor del fragmento C3d) y CD81 a través de dos dominios extracelulares de tipo Ig de tipo C2, formando junto con CD225 el complejo BCR. El dominio intracelular de CD19 está implicado en cascadas de señalización intracelular, regulando principalmente, pero no exclusivamente, las señales aguas abajo del BCR y del CD22 (Mei *et al.* (2012) "Rationale of Anti-CD19 Immunotherapy: An Option To Target Autoreactive Plasma Cells In Autoimmunity", *Arthritis Res and Ther.* 14(Supl. 5):S1; Wang *et al.* (2012) "CD19: A Biomarker For B Cell Development, Lymphoma Diagnosis And Therapy", *Exp. Hematol. and Oncol.* 1:36); Del Nagro *et al.* (2005) "CD19 Function in Central and Peripheral B-Cell Development", *Immunologic Res.* 31:119-131).

Varias propiedades de CD19 sugieren su posible potencial como una diana para la inmunoterapia. CD19 es uno de los antígenos expresados de forma más ubicua en el linaje de linfocitos B y se expresa en >95 % de las neoplasias malignas de linfocitos B, incluyendo la leucemia linfoblástica aguda (LLA), la leucemia linfocítica crónica (LLC) y el linfoma no Hodgkin (LNH) (Wilson, K. *et al.* (2010) "Flow Minimal Residual Disease Monitoring Of Candidate Leukemic Stem Cells Defined By The Immunophenotype, CD34+CD38lowCD19+ In B-Lineage Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia", *Haematologica* 95(4):679-683; Maloney, D.G. *et al.* (1997) "IDE-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy In Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma", *Blood* 90(6):2188-2195; Vose, J.M. (1998) "Current Approaches To The Management Of Non-Hodgkin's Lymphoma", *Semin. Oncol.* 25(4):483-491; Nagorsen, D. *et al.* (2012) "Blinatumomab: A Historical Perspective", *Pharmacol. Ther.* 136(3):334-342; Topp, M.S. *et al.* (2011) "Targeted Therapy With The T-Cell-Engaging Antibody Blinatumomab Of Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease In B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results In High Response Rate And Prolonged Leukemia-Free Survival", *J. Clin. Oncol.* 20 de junio de 2011;29(18):2493-2498; Nadler, *et al.* (1983) "B4, A Human B Lymphocyte-Associated Antigen Expressed On Normal, Mitogen-Activated, And Malignant B Lymphocytes". *J. Immunol.*; 131:244-250; Ginaldi *et al.* (1998) "Levels Of Expression Of CD19 And CD20 In Chronic B Cell Leukaemias", *J. Clin. Pathol.* 51:364-369; Anderson *et al.* (1984) "Expression of Human B Cell-Associated Antigens on Leukemias and Lymphomas: A Model of Human B Cell Differentiation", *Blood* 63:1424-1433). CD19 se expresa en pocos o en ningún otro tipo celular y tampoco se expresa en células plasmáticas diferenciadas terminalmente, por lo que se los puede evitar con las terapias dirigidas por CD19. CD19 no se elimina con la circulación y puede internalizarse

- rápidamente (Ma *et al.* (2002) "Radioimmunotherapy For Model B Cell Malignancies Using 90Y-Labeled Anti-CD19 And Anti-CD20 Monoclonal Antibodies" Leukemia 16:60-66; Raufi *et al.* (2013) "Targeting CD19 in B-cell lymphoma: emerging role of SAR3419", Cancer Management Res 3:225-233). De manera notable, la expresión de CD19 se mantiene en los linfomas de linfocitos B que se vuelven resistentes a la terapia anti-CD20 (Davis *et al.* (1999) "Therapy of B-cell Lymphoma With Anti-CD20 Antibodies Can Result In The Loss Of CD20 Antigen Expression". Clin Cancer Res, 5:611-615, 1999). CD19 también se ha sugerido como una diana para tratar enfermedades autoinmunes (Tedder (2009) "CD19: A Promising B Cell Target For Rheumatoid Arthritis", Nat. Rev. Rheumatol. 5:572-577).
- 5 Las neoplasias malignas de linfocitos B representan un grupo heterogéneo de trastornos con características y comportamiento clínico muy variados. Históricamente, la mayoría de los pacientes con enfermedad sintomática recibieron una combinación de agentes genotóxicos sin reacción cruzada con la intención de lograr una remisión duradera y en algunos casos, una cura. Aunque eficaces, muchos regímenes tradicionales también se asocian a toxicidades agudas y a largo plazo considerables (véase, por ejemplo, Stock, W. *et al.* (2013) "Dose Intensification Of Daunorubicin And Cytarabine During Treatment Of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: Results Of Cancer And Leukemia Group B Study 19802", Cancer. 1 de enero de 2013;119(1):90-98). El anticuerpo monoclonal anti-CD20 **rituximab** se utiliza para el tratamiento de muchos trastornos de los linfocitos B, en donde puede emplearse junto con agentes de "tratamiento de referencia" o emplearse como un agente único (Fowler *et al.* (2013) "Developing Novel Strategies to Target B-Cell Malignancies", Targeted Pathways, B-Cell Lymphoma en el libro educativo de ASCO, págs. 366-372; Bargou, R. *et al.* (2008) "Tumor Regression In Cancer Patients By Very Low Doses Of A T Cell-Engaging Antibody", Science 321(5891):974-977; Thomas, D.A. *et al.* (2010) "Chemoimmunotherapy With A Modified Hyper-CVAD And Rituximab Regimen Improves Outcome In De Novo Philadelphia Chromosome-Negative Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia", J. Clin. Oncol. 28(24):3880-3889). A pesar de los resultados clínicos alentadores, la repetición del tratamiento de pacientes con linfomas insidiosos con rituximab de agente único se ha asociado con una tasa de respuesta de solo un 40 %, lo que sugiere que la resistencia puede ocurrir en los linfocitos B malignos como una respuesta a la exposición prolongada a rituximab (Smith (2003) "Rituximab (Monoclonal Anti-CD20 Antibody): Mechanisms Of Action And Resistance". Oncogene. 22:7359-68; Davis *et al.* (1999) "Therapy of B-cell Lymphoma With Anti-CD20 Antibodies Can Result In The Loss Of CD20 Antigen Expression", Clin Cancer Res, 5:611-615, 1999; Gabrilovich, D. *et al.* (2003) "Tumor Escape From Immune Response: Mechanisms And Targets Of Activity", Curr. Drug Targets 4(7):525-536). Se ha informado de que unas líneas celulares resistentes a rituximab generadas *in vitro* muestran resistencia cruzada a múltiples agentes quimioterapéuticos (Czuczman *et al.* (2008) "Acquisition Of Rituximab Resistance In Lymphoma Cell Lines Is Associated With Both Global CD20 Gene And Protein Down-Regulation Regulated At The Pretranscriptional And Post-transcriptional Levels", Clin Cancer Res. 14:1561-1570; Olejniczak *et al.* (2008) "Acquired Resistance To Rituximab Is Associated With Chemotherapy Resistance Resulting From Decreased Bax And Bak Expression", Clin Cancer Res. 14:1550-1560).
- 10 35 Los antígenos de superficie de linfoma de linfocitos B adicionales dirigidos por anticuerpos terapéuticos incluyen CD19 (Hoelzer (2013) "Targeted Therapy With Monoclonal Antibodies In Acute Lymphoblastic Leukemia, Curr. Opin. Oncol. 25:701-706; Hammer (2012) "CD19 As An Attractive Target For Antibody-Based Therapy", mAbs 4:571-577). Sin embargo, a pesar de las potentes actividades anti-linfoma asociadas con la internalización compleja y la liberación intracelular de fármaco libre que se han notificado para varios anticuerpos anti-CD19, anticuerpos biespecíficos que tienen una porción de unión anti-CD19 o conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC, por sus siglas en inglés), los efectos antitumorales de estos anticuerpos anti-CD 19 o de los ADC resultaron variables, lo que sugiere que las propiedades específicas de los anticuerpos, como la unión de epítopos, la capacidad de inducir la oligomerización de CD19 o las diferencias en la señalización intracelular afectan a sus potencias (Du *et al.* (2008) "Differential Cellular Internalization Of Anti-CD19 And -CD22 Immunotoxins Results In Different Cytotoxic Activity", Cancer Res. 68:6300-6305; Press *et al.* (1994) "Retention Of B-Cell-Specific Monoclonal Antibodies By Human Lymphoma Cells. Blood", 83:1390-1397; Szatrowski *et al.* (2003) "Lineage Specific Treatment Of Adult Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia In First Remission With Anti-B4-Blocked Ricin Or High-Dose Cytarabine: Cancer And Leukemia Group B Study 9311", Cancer 97:1471-1480; Frankel *et al.* (2013) "Targeting T Cells To Tumor Cells Using Bispecific Antibodies", Curr. Opin. Chem. Biol. 17:385-392).
- 15 40 45 50 Por tanto, a pesar de las mejoras en la supervivencia de muchos, la mayoría de los pacientes que padecen neoplasias malignas de linfocitos B continúan recayendo tras una quimioinmunoterapia convencional y más de 15.000 pacientes mueren todavía anualmente en Estados Unidos de cánceres de linfocitos B. Por consiguiente, se necesitan tratamientos con nuevos compuestos sin resistencia cruzada para mejorar aún más la supervivencia de los pacientes.
- 55
- B. CD3**
- 60 CD3 es un coreceptor de linfocitos T compuesto por cuatro cadenas distintas (Wucherpfennig, KW *et al.* (2010) "Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling", Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2(4):a005140; páginas 1-14; Chetty, R. *et al.* (1994) "CD3: Structure, Function, And Role Of Immunostaining In Clinical Practice", J. Pathol. 173(4):303-307; Guy, C.S. *et al.* (2009) "Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex", Immunol. Rev. 232(1):7-21).
- 65 65 En mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 $\gamma$ , una cadena CD3 $\delta$  y dos cadenas CD3 $\epsilon$ . Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como el receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) para generar una

5 señal de activación en los linfocitos T (Smith-Garvin, J.E. *et al.* (2009) "T Cell Activation", *Annu. Rev. Immunol.* 27:591-619). 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). El CD3 se encuentra unido a las membranas de todos los linfocitos T maduros y prácticamente no se encuentra en ningún otro tipo de célula (véase, Janeway, C.A. *et al.* (2005) En: *IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE*", 6<sup>a</sup> ed. Garland Science Publishing, Nueva York, págs. 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 CD3ε:γ Heterodimer", *Cell* 105(7):913-923; Kuhns, M.S. *et al.* (2006) "Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex", *Immunity*. Febrero de 2006; 24(2):133-139).

10 15 20 El componente de señalización invariable CD3ε del complejo del receptor de linfocitos T (TCR) en los linfocitos T, se ha utilizado como una diana para forzar la formación de una sinapsis inmunológica entre los linfocitos T y las células tumorales. La captación conjunta de CD3 y el antígeno tumoral activa los linfocitos T, desencadenando la lisis de las células tumorales que expresan el antígeno tumoral (Baeuerle *et al.* (2011) "Bispecific T Cell Engager For Cancer Therapy" En: *BISPECIFIC ANTIBODIES*, Kontermann, R.E. (Ed.) Springer-Verlag; 2011:273-287). Este enfoque permite que los anticuerpos biespecíficos interactúen globalmente con el compartimiento de los linfocitos T con alta especificidad para las células tumorales y es aplicable ampliamente a una vasta gama de antígenos tumorales de la superficie celular.

## 25 30 35 40 45 50 55 60 65 C. Anticuerpos y otras moléculas de unión

Los "anticuerpos" son moléculas de inmunoglobulina capaces de unirse de manera específica a una diana, tales como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, situado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se utiliza en el presente documento, el término no solo abarca anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también mutantes de los mismos, variantes de origen natural, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo con un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados y anticuerpos químicos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida.

30 35 40 45 50 55 60 65 La capacidad de un anticuerpo intacto, no modificado, (por ejemplo, una IgG) para unirse a un epítopo de un antígeno depende de la presencia de dominios variables en las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina (es decir, los dominios VL y VH, respectivamente). La interacción de una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo y en particular, la interacción de sus dominios VL y VH, forma uno de los sitios de unión al epítopo del anticuerpo. Por el contrario, la construcción scFv comprende un dominio VL y VH de un anticuerpo contenido en una sola cadena polipeptídica, en donde los dominios están separados por un enlazador flexible de suficiente longitud para permitir el autoensamblaje de los dos dominios produciendo un sitio de unión al epítopo funcional. Cuando el autoensamblaje de los dominios VL y VH es imposible debido a un enlazador de insuficiente longitud (inferior a aproximadamente 12 restos de aminoácido), dos de las construcciones scFv interactúan entre sí para formar una molécula bivalente en la que la VL de una cadena se asocia con la VH de la otra (revisado en Marvin *et al.* (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658).

Además de sus usos conocidos en el diagnóstico, se ha demostrado que los anticuerpos son útiles como agentes terapéuticos. En las últimas décadas se ha visto un resurgimiento del interés en el potencial terapéutico de los anticuerpos y los anticuerpos se han convertido en una de las clases principales de fármacos derivados de la biotecnología (Chan, C.E. *et al.* (2009) "The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases", *Singapore Med. J.* 50(7):663-666). Se han aprobado cerca de 200 fármacos basados en anticuerpos para su uso o están en desarrollo.

50 55 60 65 Los anticuerpos naturales son capaces de unirse a una sola especie de epítopo (es decir, son "monoespecíficos"), aunque pueden unir múltiples copias de esa especie (es decir, mostrar bivalencia o multivalencia). Se ha desarrollado una amplia diversidad de formatos de anticuerpos biespecíficos recombinantes (véanse, por ejemplo, las publicaciones del PCT n.º WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968), la mayoría de los cuales utilizan péptidos enlazadores para fusionar el núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) a otra proteína de unión (por ejemplo, scFv) o para fusionar, por ejemplo, dos fragmentos Fab o dos scFv. Normalmente, tales enfoques implican compromisos y compensaciones. Por ejemplo, las publicaciones del PCT n.º WO 2013/174873, WO 2011/133886 y WO 2010/136172 desvelan que el uso de enlazadores puede causar problemas en entornos terapéuticos y enseñan un anticuerpo triespecífico en el que los dominios CL y CH1 están cambiados con respecto a sus respectivas posiciones naturales y los dominios VL y VH se han diversificado (documentos WO 2008/027236; WO 2010/108127) para permitir la unión a más de un antígeno. Por tanto, las moléculas desveladas en estos documentos cambian la especificidad de unión por la capacidad de unirse a especies de antígeno adicionales. Las publicaciones del PCT n.º WO 2013/163427 y WO 2013/119903 desvelan la modificación del dominio CH2 para que contenga un aducto de proteína de fusión que comprende un dominio de unión. El documento señala que el dominio CH2 probablemente solo juega un papel mínimo en la mediación de la función efectora. Las publicaciones del PCT n.º WO 2010/028797, WO2010028796 y WO 2010/028795 desvelan anticuerpos recombinantes cuyas regiones Fc se han reemplazado con dominios VL y VH adicionales, para formar moléculas de unión trivalentes. Las publicaciones del

PCT n.º WO 2003/025018 y WO2003012069 desvelan diacuerpos recombinantes cuyas cadenas individuales contienen dominios scFv. Las publicaciones del PCT n.º WO 2013/006544 desvelan moléculas Fab multivalentes que se sintetizan como una única cadena polipeptídica y luego se someten a proteólisis para producir estructuras heterodiméricas. Por tanto, las moléculas desveladas en estos documentos cambian toda o parte de la capacidad de 5 mediar la función efectora por la capacidad de unirse a especies de antígenos adicionales. Las publicaciones del PCT n.º WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 y WO 1991/003493 divultan la adición de dominios de unión o grupos funcionales adicionales a un anticuerpo o una porción de anticuerpo (por ejemplo, añadiendo un diacuerpo a la cadena ligera del anticuerpo o añadiendo dominios VL y VH adicionales a las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo o añadiendo 10 una proteína de fusión heteróloga o encadenando múltiples dominios Fab entre sí).

Por tanto, las moléculas desveladas en estos documentos cambian la estructura del anticuerpo nativo por la capacidad de unirse a especies de antígeno adicionales.

15 La técnica también ha señalado la capacidad de producir **diacuerpos** que difieren de tales anticuerpos naturales en ser capaces de unirse a dos o más especies de epítopos diferentes (es decir, al presentar biespecificidad o multiespecificidad además de bivalencia o multivalencia) (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.* (1993) "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 90:6444-6448; documento US 2004/0058400 (Hollinger *et al.*); documento US 2004/0220388 (Mertens *et al.*); Alt *et al.* (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-20 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; documento WO 02/02781 (Mertens *et al.*); Olafsen, T. *et al.* (2004) "Covalent Disulfide-Linked 25 Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Protein Eng Des Sel. 17(1):21-27; Wu, A. *et al.* (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single-chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", Protein Engineering 14(2): 1025-1033; Asano *et al.* (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Resumen 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. *et al.* (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8): 583-588; Baeuerle, P.A. *et al.* (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", Cancer Res. 69(12):4941-4944).

30 30 El diseño de un diacuerpo se basa en los fragmentos de región variable de cadena única (**scFv**). Tales moléculas se fabrican uniendo regiones variables de cadena ligera y/o pesada usando un péptido de enlace corto. Bird *et al.* (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-426) describe un ejemplo de péptidos enlazadores que forman un puente de aproximadamente 3,5 nm entre el extremo carboxilo de una región variable y el extremo amino de la otra región variable. Se han diseñado y utilizado enlazadores de otras secuencias (Bird *et al.* (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-426). Los enlazadores, a su vez, se pueden modificar para funciones adicionales, tales como la fijación de fármacos o la fijación a soportes sólidos. Las variantes monocatenarias pueden producirse de forma recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, se puede utilizar un sintetizador automático. Para la producción recombinante de scFv, se puede introducir un plásmido adecuado que 40 contiene un polinucleótido que codifica el scFv en una célula hospedadora adecuada, eucariota, tal como levaduras, células vegetales, de insecto o de mamífero o procariota, tal como *E. coli*. Se pueden preparar polinucleótidos que codifican el scFv de interés mediante manipulaciones de rutina, tal como el ligamiento de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse usando técnicas estándar de purificación de proteínas conocidas en la técnica.

45 45 La patente de Estados Unidos n.º 7.585.952 y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2010-0173978 se refieren a moléculas de scFv que son inmunoespecíficas para ErbB2. Se han descrito los captadores biespecíficos de linfocitos T ("BiTE"), un tipo de molécula scFv (WO 05/061547; Baeuerle, P *et al.* (2008) "BiTE: A New Class Of Antibodies That Recruit T Cells", Drugs of the Future 33: 137-147; Bargou, *et al.* 2008) "Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody", Science 321: 974-977). Tales moléculas están 50 compuestas por una única molécula de cadena polipeptídica que tiene dos dominios de unión a antígeno, de los que uno se une inmunoespecíficamente a un epítopo de CD3 y el otro se une inmunoespecíficamente a un antígeno presente en la superficie de una célula diana.

55 55 Se han descrito moléculas biespecíficas que se dirigen tanto a CD19 como a CD3. El blinatumomab, un BiTE biespecífico de scFv-CD19 x CD3 se encuentra en ensayos clínicos y se ha notificado que tiene una afinidad por CD3 de ~100 nM y una afinidad por CD19 de ~1 nM. Blinatumomab muestra una CE<sub>50</sub> para la lisis de células diana *in vitro* de ~10-100 pg/ml (Frankel *et al.* (2013) "Targeting T Cells To Tumor Cells Using Bispecific Antibodies", Curr. Opin. Chem. Biol. 17:385-392). También se ha desarrollado un redireccionamiento de doble afinidad (DART, por sus siglas en inglés) biespecífico de CD19 x CD3 (Moore *et al.* (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To 60 Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", Blood 117(17):4542-4551). En comparación con el BiTE biespecífico de scFv-CD19 x CD3, esta molécula mostró afinidades de unión similares pero tuvo una CE<sub>50</sub> más baja para la lisis de células diana *in vitro* de ~0.5 a 5 pg/ml y mostró niveles coherentemente más altos de lisis máxima AFM11, también se ha descrito un Tandab biespecífico de CD19 x CD3. Se ha notificado que AFM11 tiene una CE<sub>50</sub> para la lisis de células diana *in vitro* de ~0,5 a 5 pg/ml (Zhukovsky *et al.* (2013) "A CD19/CD3 Bispecific Tandab, AFM11, Recruits T Cells To Potently and Safely Kill CD19+ Tumor Cells", J Clin Oncol 31,2013 (supl.; res. 3068)). Ninguna de estas construcciones incluye un dominio Fc.

- A pesar de tal éxito, la producción de diacuerpos estables, heterodiméricos funcionales, no monoespecíficos, puede optimizarse además mediante la especial consideración y colocación de los restos de cisteína en una o más de las cadenas polipeptídicas empleadas. Tales diacuerpos optimizados se pueden producir con mayor rendimiento y con mayor actividad que los diacuerpos no optimizados. Por tanto, la presente descripción se dirige por tanto al problema de proporcionar polipéptidos que se diseñen y optimicen particularmente para formar diacuerpos heterodiméricos. La invención resuelve este problema a través de la provisión de diacuerpos de CD19 x CD3 optimizados ilustrativos.
- 5 El documento WO2016122702A1 describe moléculas de unión a DR5 multivalentes que comprenden un(os) dominio(s) de unión de anticuerpos anti-DR5 y en particular, un(os) dominio(s) de unión de anticuerpos anti-DR5 humanos. Las moléculas de unión a DR5 incluyen moléculas bivalentes y tetravalentes que tienen dos, tres o cuatro dominios de unión a DR5, cada uno capaz de unirse a DR5 humano.
- 10 También se describen diacuerpos que comprenden un complejo unido covalentemente de dos o más cadenas polipeptídicas. El documento US2010174053A1 describe moléculas de diacuerpo y los usos de las mismas en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo trastornos inmunológicos, enfermedad infecciosa, intoxicación y cánceres. Las moléculas de diacuerpo comprenden dos cadenas polipeptídicas que se asocian para formar al menos dos sitios de unión al epítopo, que pueden reconocer epítopos iguales o diferentes en antígenos iguales o diferentes.
- 15 20 El documento US2014099318A1 describe moléculas de unión a CD3 capaces de unirse a CD3 humano y no humano y en particular, a aquellas moléculas que reaccionan de forma cruzada con CD3 de un mamífero no humano (por ejemplo, un mono cinomolgo).
- 25 30 35 40 45 50 55 60 65 El documento WO2012162068A2 describe un polipéptido (por ejemplo, una molécula de unión a antígeno) que comprende una porción polipeptídica de una proteína de unión al suero desinmunizada capaz de unirse a dicha proteína sérica. La presencia de la proteína de unión al suero prolonga la semivida sérica del polipéptido, en relación con la semivida sérica del polipéptido si falta la porción polipeptídica de la proteína de unión al suero desinmunizada.
- Sumario de la invención:**
- De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un diacuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 del presente documento. Se describen diacuerpos monovalentes biespecíficos que comprenden dos cadenas polipeptídicas y que poseen un sitio de unión específico para un epítopo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítopo de CD3 (es decir, un "diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3"). Lo más preferentemente, tales diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 están compuestos por tres cadenas polipeptídicas y poseen un sitio de unión específico para un epítopo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítopo de CD3 y comprenden adicionalmente un dominio Fc de inmunoglobulina (es decir, un "diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3"). Los diacuerpos monovalentes biespecíficos y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente descripción son capaces de unirse simultáneamente a CD19 y CD3. También se describen composiciones farmacéuticas que contienen tales diacuerpos monovalentes biespecíficos o tales diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos. También se describen métodos para el uso de dichos diacuerpos en el tratamiento de enfermedades, en particular, en neoplasias hematológicas.
- Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la descripción comprenden por tanto al menos dos cadenas polipeptídicas diferentes. Las cadenas polipeptídicas de tales diacuerpos se asocian entre sí de manera heterodimérica para formar un sitio de unión específico para un epítopo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítopo de CD3. Un diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 o un diacuerpo Fc monovalente biespecífico de la presente descripción es por tanto monovalente, por cuanto es capaz de unirse a una sola copia de un epítopo de CD19 y a una sola copia de un epítopo de CD3, pero biespecífico, en tanto que un solo diacuerpo es capaz de unirse simultáneamente al epítopo de CD19 y al epítopo de CD3. Cada una de las cadenas polipeptídicas de los diacuerpos se une covalentemente a otra cadena polipeptídica del diacuerpo, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro de restos de cisteína situados dentro de dichas cadenas polipeptídicas, para formar un complejo unido covalentemente. En descripciones particulares, los diacuerpos de la presente descripción tienen además un dominio Fc de inmunoglobulina y/o un dominio de unión a albúmina para prolongar la semivida *in vivo*.
- De manera detallada, la descripción proporciona un diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3 capaz de unirse específicamente a CD19 y a CD3, en donde el diacuerpo comprende una primera, una segunda y una tercera cadena polipeptídica, en donde las cadenas polipeptídicas forman un complejo unido covalentemente y en donde:
- I. la primera cadena polipeptídica comprende, en la dirección de N-terminal a C-terminal:
    - A. un dominio IA, que comprende
      - (1) un subdominio (IA1), que comprende un dominio VL capaz de unirse a CD19 (VL<sub>CD19</sub>) o a CD3 (VL<sub>CD3</sub>);

y  
(2) un subdominio (IA2), que comprende un dominio VH capaz de unirse a CD19 (VH<sub>CD19</sub>) o a CD3 (VH<sub>CD3</sub>); en donde los subdominios IA1 e IA2 están separados entre sí por un enlazador polipeptídico y son

- 5 (a) VLCD<sub>19</sub> y VHCD<sub>3</sub>; o  
(b) VLCD<sub>3</sub> y VHCD<sub>19</sub>;

B. un dominio IB, que comprende un dominio promotor de heterodímeros cargado, en donde el dominio IB está separado del dominio IA por un enlazador polipeptídico;

10 C. un dominio IC, que comprende un dominio CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> de un anticuerpo; y

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

- 15 A. un dominio IIA, que comprende  
(1) un subdominio (IIA1), que comprende un dominio VL capaz de unirse a CD19 ( $VL_{CD19}$ ) o a CD3 ( $VL_{CD3}$ ); y  
(2) un subdominio (IIA2), que comprende un dominio VH capaz de unirse a CD19 ( $VH_{CD19}$ ) o a CD3 ( $VH_{CD3}$ ); en donde los subdominios IIA1 y IIA2 están separados entre sí por un enlazador polipeptídico y son:  
20 (a)  $VL_{CD19}$  y  $VH_{CD3}$ , si los subdominios IA1 e IA2 son  $VL_{CD3}$  y  $VH_{CD19}$ ; o  
(b)  $VL_{CD3}$  y  $VH_{CD19}$ , si los subdominios IA1 e IA2 son  $VL_{CD19}$  y  $VH_{CD3}$ ;

25 B. un dominio IIB, que comprende un dominio promotor de heterodímeros cargado, en donde el dominio IIB está separado del dominio IIA por un enlazador polipeptídico y en donde el dominio promotor de heterodímeros cargado del dominio IB y el dominio promotor de heterodímeros cargado del dominio IIB tienen cargas opuestas; y  
30 III. la tercera cadena polipeptídica comprende, en la dirección de N-terminal a C-terminal un dominio IIIC que comprende un dominio CH2-CH3 de un anticuerpo; en donde los dominios  $VL_{CD19}$  y  $VH_{CD19}$  forman un dominio de unión a CD19 y los dominios  $VL_{CD3}$  y  $VH_{CD3}$  forman un dominio de unión a CD3; y los dominios CH2-CH3 de la primera y de la tercera cadena polipeptídica forman un dominio Fc capaz de unirse a un receptor Fc, formando así el diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3.  
35 También se describe el diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3 indicado anteriormente, en donde:

35 También se describe el diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3 indicado anteriormente, en donde:

- (A) los dominios IB y IIB comprenden cada uno un resto de cisteína que une covalentemente la primera cadena polipeptídica a la segunda cadena polipeptídica a través de un enlace disulfuro; y  
(B) los dominios IC y IIIC comprenden cada uno un resto de cisteína que une covalentemente la primera cadena polipeptídica a la tercera cadena polipeptídica a través de un enlace disulfuro.

También se describe cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 indicados anteriormente, en donde la VL<sub>CD19</sub> tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 17** y la VH<sub>CD19</sub> tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:21**.

45 También se describe cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 indicados anteriormente, donde la VL<sub>CD3</sub> tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 25** y la VH<sub>CD3</sub> tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 29**.

50 También se describe cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 indicados anteriormente, donde el dominio CH2-CH3 del dominio IC tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 15** y el dominio CH2-CH3 del dominio IIIC tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:16**.

55 También se describe cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 indicados anteriormente, en donde

- (A) el dominio promotor de heterodímeros cargado del dominio IB tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 10** y el dominio promotor de heterodímeros cargado del dominio IIB tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 11**; o

60 (B) el dominio promotor de heterodímeros cargado del dominio IB tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 12** y el dominio promotor de heterodímeros cargado del dominio IIB tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 13**.

65 También se describe cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 indicados anteriormente en donde:

- (A) la primera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 35**;  
 (B) la segunda cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 37**; y  
 (C) la tercera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 39**.

5 También se describe cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 indicados anteriormente, que son capaces de reaccionar de forma cruzada con CD19 y CD3 humanos y de primates.

También se describe cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 descritos anteriormente para su uso como producto farmacéutico.

10 15 20 También se describe cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 descritos anteriormente para usar en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada o caracterizada por la expresión de CD19 o en un método para tratar una enfermedad o afección caracterizada por la expresión de CD19, particularmente en donde la enfermedad o condición asociada con CD19 o caracterizada por su expresión, es cáncer y más particularmente, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), incluida la crisis blástica de LMC y el oncogén Abelson asociado con LMC (translocación Bcr-ABL), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia linfoblástica aguda de precursores de linfocitos B (B-ALL, por sus siglas en inglés), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica (LLC), incluyendo el síndrome de Richter o la transformación de Richter de LLC, tricoleucemia (HCL, por sus siglas en inglés), neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas (BPDCN, por sus siglas en inglés), linfoma no Hodgkin (LNH), incluyendo la leucemia de células del manto (MCL, por sus siglas en inglés) y linfoma linfocítico pequeño (SLL, por sus siglas en inglés), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica y linfoma de Burkitt.

25 También se describe un complejo polipeptídico asociado covalentemente, en donde el complejo polipeptídico comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, en donde:

- (A) la primera cadena polipeptídica comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 2** unido a un dominio promotor de heterodímeros que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 12**; y

30 (B) la segunda cadena polipeptídica comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 2** unido a un dominio promotor de heterodímeros que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 13**;

35 en donde los dominios promotores de heterodímeros de la primera cadena polipeptídica y los dominios promotores de heterodímeros de la segunda cadena polipeptídica están unidos covalentemente entre sí a través de un enlace disulfuro.

También se describe una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 descritos anteriormente y un vehículo fisiológicamente aceptable. También se describe el uso de tal composición farmacéutica en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con CD19 o caracterizada por su expresión, particularmente en donde la enfermedad o condición asociada con CD19 o caracterizada por su expresión, es cáncer y más particularmente, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), incluida la crisis blástica de LMC y el oncogén Abelson asociado con LMC (translocación Bcr-ABL), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia linfoblástica aguda de precursores de linfocitos B (B-ALL, por sus siglas en inglés), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica (LLC), incluyendo el síndrome de Richter o la transformación de Richter de LLC, tricoleucemia (HCL), neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas (BPDCN), linfoma no Hodgkin (LNH), incluyendo la leucemia de células del manto (MCL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica y linfoma de Burkitt.

50 55 Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción preferentemente son capaces de mostrar una afinidad de unión similar al CD3 soluble humano y de mono cinomolgo y una diferencia de 10 veces en la unión a CD19, según lo analizado por tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) (BIAcore) o según lo analizado por citometría de flujo utilizando una población de linfocitos T seleccionados por CD4+ y CD8+ y una población de linfocitos B seleccionados por CD20+.

60 65 Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción son preferentemente capaces de mediar en la destrucción redirigida de células tumorales diana utilizando linfocitos T humanos en un ensayo que emplea cualquiera de las 3 líneas celulares de linfoma B diana, Raji/GF (linfoma de Burkitt), HBL-2 (linfoma de células del manto) o Jeko-1 (linfoma de células del manto) y usando linfocitos T primarios humanos purificados como células efectoras. En dicho ensayo, la destrucción de células tumorales diana se mide utilizando un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), en el que la actividad enzimática de la LDH liberada de las células se mide cuantitativamente tras la muerte celular o mediante un ensayo de luciferasa en el que la unidad de luz relativa (RLU, por sus siglas en inglés) de luciferasa es la lectura para indicar la viabilidad relativa de las células diana Raji/GF, que se han modificado por ingeniería genética para expresar

tanto la proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) como los genes indicadores de luciferasa. La CE50 observada de dicha destrucción redirigida es de aproximadamente 5 pM o menos, aproximadamente 3 pM o menos, aproximadamente 1 pM o menos, aproximadamente 0,5 pM o menos, aproximadamente 0,3 pM o menos, aproximadamente 0,2 pM o menos, aproximadamente 0,1 pM o menos, aproximadamente 0,05 pM o menos, aproximadamente 0,04 pM o menos, aproximadamente 0,03 pM o menos, aproximadamente 0,02 o menos o aproximadamente 0,01 nM o menos.

5 Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción preferentemente son capaces de mediar la citotoxicidad en células mononucleares

10 de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) humanas y de mono cinomolgo, de manera que causan un agotamiento de linfocitos B CD20+ dependiente de la dosis en ambos sistemas celulares en una relación de células efectoras a linfocitos T de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 o 9:1. La CE50 observada del agotamiento de linfocitos B CD20+ humanos es de aproximadamente 7 pM o menos, aproximadamente 5 pM o menos, aproximadamente 3 pM o menos, aproximadamente 1 pM o menos, aproximadamente 0,5 pM o menos, aproximadamente 0,3 pM o menos,

15 aproximadamente 0,2 pM o menos, aproximadamente 0,1 pM o menos, aproximadamente 0,05 pM o menos, aproximadamente 0,04 pM o menos, aproximadamente 0,03 pM o menos, aproximadamente 0,02 o menos o aproximadamente 0,01 nM o menos. La CE50 observada del agotamiento de linfocitos B CD20+ de cinomolgo es de

20 aproximadamente 1000 pM o menos, aproximadamente 900 pM o menos, aproximadamente 800 pM o menos, aproximadamente 500 pM o menos, aproximadamente 300 pM o menos, aproximadamente 100 pM o menos, aproximadamente 50 pM o menos, aproximadamente 20 pM o menos, aproximadamente 10 pM o menos, aproximadamente 5 pM o menos, aproximadamente 2 pM o menos o aproximadamente 1 pM o menos, de modo que la relación de agotamiento de linfocitos B humanos autólogos a agotamiento de linfocitos B de mono cinomolgo es de

25 aproximadamente 500:1 o menos, aproximadamente 300:1 o menos, aproximadamente 100:1 o menos, aproximadamente 50:1 o menos, aproximadamente 20:1 o menos o aproximadamente 10:1 o menos.

25 Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción preferentemente son capaces de mediar en la liberación de citocinas (por ejemplo, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 y especialmente IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) por PBMC humanas y de mono cinomolgo. Tal liberación es de aproximadamente 5000 pg/ml o menos, aproximadamente 4000 pg/ml o menos, aproximadamente 3000 pg/ml o menos, aproximadamente 2000 pg/ml o menos, aproximadamente 1000 pg/ml o menos, aproximadamente 500 pg/ml o menos, aproximadamente 2000 pg/ml o menos o aproximadamente 100 pg/ml o menos. La CE50 media de tal liberación de citocinas de las PBMC humanas es de aproximadamente 100 pM o menos, aproximadamente 90 pM o menos, aproximadamente 80 pM o menos, aproximadamente 50 pM o menos, aproximadamente 30 pM o menos, aproximadamente 20 pM o menos, aproximadamente 10 o menos o aproximadamente 5 nM o menos. La CE50 media de tal liberación de citocinas de las PBMC de mono cinomolgo es de

30 aproximadamente 3000 pM o menos, aproximadamente 2000 pM o menos, aproximadamente 1000 pM o menos, aproximadamente 500 pM o menos, aproximadamente 300 pM o menos, aproximadamente 200 pM o menos, aproximadamente 100 o menos o aproximadamente 50 nM o menos.

40 Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción preferentemente son capaces de mediar en la inhibición del crecimiento tumoral del linfoma de linfocitos B humano en un xenoinjerto mixto en el que tales moléculas se introducen en ratones NOD/SCID junto con células tumorales HBL-2 (un linfoma de células del manto humano) o Raji (linfoma de Burkitt) y linfocitos T humanos activados en una relación de 1:5. Preferentemente, tales diacuerpos son capaces de inhibir el crecimiento tumoral cuando se proporcionan en una concentración superior a 100  $\mu$ g/ml, a una concentración de aproximadamente 100  $\mu$ g/kg, a una concentración de aproximadamente 80  $\mu$ g/kg, a una concentración de aproximadamente 50  $\mu$ g/kg, a una concentración de aproximadamente 20  $\mu$ g/kg, a una concentración de aproximadamente 10  $\mu$ g/kg, a una concentración de aproximadamente 5  $\mu$ g/kg, a una concentración de aproximadamente 2  $\mu$ g/kg, a una concentración de aproximadamente 1  $\mu$ g/kg, a una concentración de aproximadamente 0,5  $\mu$ g/kg, a una concentración de aproximadamente 0,2  $\mu$ g/kg, a una concentración de aproximadamente 0,1  $\mu$ g/kg, a una concentración de aproximadamente 0,05  $\mu$ g/kg, a una concentración de aproximadamente 0,02  $\mu$ g/kg, a una concentración de aproximadamente 0,01  $\mu$ g/kg o a una concentración de aproximadamente 0,005  $\mu$ g/kg o a una concentración inferior a 0,005  $\mu$ g/kg.

55 Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción preferentemente son capaces de mostrar actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto HBL-2 (linfoma de células del manto humano) en ratones hembra NSG B2m-/, implantados con células tumorales HBL-2 por vía intradérmica (ID) el Día 0 seguido de inyección intraperitoneal (IP) de PBMC el Día 4 y de la administración del diacuerpo el Día 17, para causar una disminución en el volumen tumoral de aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 90% o más de un 90%.

60 Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción preferentemente son capaces de mostrar semivididas prolongadas tras la introducción en un receptor humano o en un animal no humano. Tales semivididas pueden medirse introduciendo el diacuerpo en un ratón transgénico de FcRn humano (patentes de Estados Unidos N° 6.992.234 y 7.358.416; Haraya, K. (2014)

"Application Of Human FcRn Transgenic Mice As A Pharmacokinetic Screening Tool Of Monoclonal Antibody", Xenobiotica Jul de 2014;17:1-8; Proetzel, G. et al. (2014) "Humanized FcRn mouse models for evaluating pharmacokinetics of human IgG antibodies", Methods 65(1): 148-153; Stein, C. et al. (2012) "Clinical Chemistry Of Human FcRn Transgenic Mice", Mamm. Genome 23(3-4):259-269; Roopenian, D.C. et al. (2010) "Human FcRn

5 Transgenic Mice For Pharmacokinetic Evaluation Of Therapeutic Antibodies", Methods Molec. Biol. 602:93-104). La medición se realiza utilizando un ratón B6.Cg-Fcgr<sup>tm1Dcr</sup> (CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ (Número de catálogo 004919), disponible en Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, EE. UU.

10 Para evitar cualquier duda, los diacuerpos de la descripción pueden mostrar uno, dos, tres, más de tres o todos los atributos funcionales descritos en el presente documento. Por tanto, los diacuerpos de la descripción pueden mostrar cualquier combinación de los atributos funcionales descritos en el presente documento.

15 Los diacuerpos de la presente descripción pueden usarse como productos farmacéuticos. Preferentemente, los diacuerpos son para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con CD19 o caracterizada por su expresión. También se describe el uso de diacuerpos de la descripción en la fabricación de una composición farmacéutica, preferentemente para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con CD19 o caracterizada por su expresión, como se define más adelante en el presente documento.

20 La enfermedad o afección asociada con CD19 o caracterizada por su expresión puede ser una neoplasia maligna de linfocitos B (Campo, E. et al. (2011) "The 2008 WHO Classification Of Lymphoid Neoplasms And Beyond: Evolving Concepts And Practical Applications", Blood 117(19):5019-5032). Por ejemplo, el cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), incluida la crisis blástica de LMC y el oncogén Abelson asociado con LMC (translocación Bcr-ABL), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia 25 linfoblástica aguda de precursores de linfocitos B (B-ALL, por sus siglas en inglés), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica (LLC), incluyendo el síndrome de Richter o la transformación de Richter de LLC, tricoleucemia (HCL), neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas (BPDCN), linfoma no Hodgkin (LNH), incluyendo la leucemia de células del manto (MCL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica y linfoma de Burkitt.

30 También se describe una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los diacuerpos descritos anteriormente y un vehículo fisiológicamente aceptable. La descripción pertenece particularmente a tal composición farmacéutica en donde la enfermedad o afección tratada es refractaria al tratamiento con rituximab.

35 También se describe un uso de la composición farmacéutica descrita anteriormente en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con CD19 o caracterizada por su expresión.

40 También se describe tal uso, en donde la enfermedad o afección asociada con CD19 o caracterizada por su expresión es una neoplasia maligna de linfocitos B (especialmente un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), incluida la crisis blástica de LMC y el oncogén Abelson asociado con LMC (translocación Bcr-ABL), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia linfoblástica aguda de precursores de linfocitos B (B-ALL, por sus siglas en inglés), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica (LLC), incluyendo el síndrome de Richter o la transformación de Richter de LLC, tricoleucemia (HCL), neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas (BPDCN), linfoma no Hodgkin (LNH), incluyendo la leucemia de células del manto (MCL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica y linfoma de Burkitt).

45 Las expresiones tales como "aproximadamente" deben entenderse dentro del 10 %, más preferentemente dentro del 5%, del valor especificado, a menos que el contexto requiera otra cosa.

50 **Breve descripción de los dibujos:**

La **Figura Comparativa 1** ilustra la estructura de un diacuerpo monovalente biespecífico asociado covalentemente compuesto por dos cadenas polipeptídicas.

55 Las **Figuras 2A y 2B** ilustran las estructuras de dos versiones de la primera, segunda y tercera cadena polipeptídica de un diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3 de tres cadenas de la presente descripción (Versión 1, **Figura 2A**; Versión 2, **Figura 2B**).

60 La **Figura 3** muestra la captación simultánea tanto de CD19 como de CD3 por **DART-A** (•). Ni el **DART 1 de control** (■) ni el **DART 2 de control** (▲) fueron capaces de unirse a ambas dianas simultáneamente.

65 Las **Figuras 4A-4B** muestran la unión de una molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) a linfocitos B CD20+ humanos (**Figura 4A**) y de mono cinomolgo (**Figura 4B**).

Las **Figuras 5A-5B** muestran la unión de la molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) a linfocitos T CD4+ y CD8+ humanos (**Figura 5A**) y de mono cinomolgo (**Figura 5B**).

- 5 Las **Figuras 6A-6F** muestran la destrucción redirigida mediada por la molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) de células diana en relación con la de **DART 1 de control**. Curvas de dosis-respuesta de citotoxicidad mediada por **DART-A** utilizando linfocitos T humanos primarios como células efectoras para las líneas celulares diana: HBL-2 (**Figura 6A**), Raji/GF (verde fluorescente) (**Figura 6B**), Jeko-1 (**Figura 6C**), Molt-13 (**Figura 6D**) y Colo205/Luc (**Figura 6F**) con la destrucción de células diana medida usando el ensayo de LDH. La **Figura 6E** muestra la destrucción de células Raji/GF según se determina utilizando un ensayo de luciferasa (RLU) para medir las células viables relativas. Los valores de CE50 para **DART-A** se muestran en cada gráfico para 1 experimento representativo. **DART-A: ▲; DART 1 de control: ▼**.
- 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 Las **Figuras 7A-7D** muestran la destrucción redirigida mediada por la molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) de las células Raji/GF diana en diferentes relaciones de células E:T (10:1 (•), 5:1 (■), y 2.5:1 (▲)). Curvas de dosis-respuesta de citotoxicidad mediada por **DART-A** (porcentaje de citotoxicidad) con linfocitos T humanos primarios como células efectoras para células diana Raji/GF CD19+ determinadas después de 24 horas de incubación (**Figura 7A**) y después de 48 horas de incubación (**Figura 7B**). Curvas de dosis-respuesta de citotoxicidad mediada por **DART-A** (porcentaje de citotoxicidad) con linfocitos T humanos primarios como células efectoras para células JIMT-1 negativas para CD19 determinadas después de 24 horas de incubación (**Figura 7C**) y después de 48 horas de incubación (**Figura 7D**) se incluyeron como controles. Se muestra 1 de 3 experimentos representativos, cada uno de los cuales usó linfocitos T de donantes independientes.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 Las **Figuras 8A-8D** muestran la destrucción redirigida mediada por la molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) de células Raji/GF diana a relaciones de células E:T más bajas de 2,5:1 (•) o 1:1 (■). Curvas de dosis-respuesta de citotoxicidad mediada por **DART-A** (porcentaje de citotoxicidad) con linfocitos T humanos primarios como células efectoras para células diana Raji/GF CD19+ determinadas después de 72 horas de incubación (**Figura 8A**) y después de 96 horas de incubación (**Figura 8B**). Curvas de dosis-respuesta de citotoxicidad mediada por **DART-A** (porcentaje de citotoxicidad) biespecífico de CD19 x CD3 con linfocitos T humanos primarios como células efectoras para células JIMT-1 negativas para CD19 determinadas después de 72 horas de incubación (**Figura 8C**) y después de 96 horas de incubación (**Figura 8D**) se incluyeron como controles. Se muestra 1 de 3 experimentos representativos, cada uno de los cuales usó linfocitos T de donantes independientes.
- 30 35 40 45 50 55 60 65 Las **Figuras 9A-9B** muestran el agotamiento de linfocitos B autólogos mediado por la molécula biespecífica CD19 x CD3 (**DART-A**) en PBMC humanas o de mono cinomolgo. Se presentan las curvas de dosis-respuesta para el agotamiento de linfocitos B autólogos mediados por DART (**DART-A o DART 1 de control**). **Figura 9A:** porcentaje de células CD20+ humanas después del tratamiento de PBMC con diferentes dosis de **DART-A o DART 1 de control**. **Figura 9B:** porcentaje de células CD20+ de mono cinomolgo después del tratamiento de PBMC con diferentes dosis de **DART-A o DART 1 de control**. Los valores de CE50 para **DART-A** se muestran en cada gráfico. El porcentaje de células CD3+ se analizó en paralelo y se usó como control de referencia interno (no se observaron cambios en ninguna concentración analizada). **DART-A: ▲; DART 1 de control: ▼**.
- 40 45 50 55 60 65 La **Figura 10** muestra la destrucción redirigida mediada por la molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) de células diana con PBMC de mono cinomolgo a E:T = 30:1. **DART-A: ▲; DART 1 de control: ▼**.
- 45 50 55 60 65 Las **Figuras 11A-11C** muestran la liberación de citocinas mediada por la molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) a partir de linfocitos T humanos en presencia de células diana. Los linfocitos T humanos se trataron con **DART-A o DART 1 de control** durante aproximadamente 24 horas en presencia de células diana Raji/GF. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron y se sometieron a medición de citocinas basada en ELISA. Se muestra un experimento representativo de 2, utilizando diferentes donantes. **Figura 11A:** liberación de  $\gamma$ -interferón (IFN $\gamma$ ); **Figura 11B:** liberación del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); **Figura 11C:** Liberación de interleucina 2 (IL-2). **DART-A: ▲; DART 1 de control: ▼**.
- 50 55 60 65 Las **Figuras 12A-12D** muestran la activación de linfocitos T humanos durante la destrucción celular redirigida por una molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) en relación con la del **DART 1 de control**. Dosis-respuesta de la inducción **mediada por DART-A** de los marcadores de activación de linfocitos T CD25 (**Figuras 12A-12B**) y CD69 (**Figuras 12C-12D**) en linfocitos T humanos CD8+ (**Figuras 12A y 12C**) y CD4+ (**Figuras 12B y 12D**) utilizando células diana Raji/GF. Se muestra un experimento representativo de 2, cada uno de los cuales usó linfocitos T de diferentes donantes. **DART-A: ▲; DART 1 de control: ▼**.
- 55 60 65 Las **Figuras 13A-13D** muestran la activación de linfocitos T de mono cinomolgo durante la destrucción celular redirigida por una molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) respecto a la del **DART 1 de control**. Dosis-respuesta de la inducción **mediada por DART-A** de los marcadores de activación de linfocitos T CD25 (**Figuras 13A y 13B**) y CD69 (**Figuras 13C y 13D**) en linfocitos T CD8+ (**Figuras 13A y 13C**) y CD4+ (**Figuras 13B y 13D**) de mono cinomolgo o PBMC utilizando células diana Raji/GF. Se muestra un experimento representativo usando linfocitos T. **DART-A: ▲; DART 1 de control: ▼**.
- 60 65 Las **Figuras 14A-14D** muestran que la molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) y el **DART 1 de control** fallan en mediar la activación de linfocitos T humanos en presencia de células JIMT1 negativas para CD19. Se

presenta una dosis-respuesta de la inducción mediada por **DART-A** de los marcadores de activación de linfocitos T CD25 (**Figuras 14A y 14B**) y CD69 (**Figuras 14C y 14D**) en CD8+ (**Figuras 14A y 14C**) y CD4+ (**Figuras 14B y 14D**) del mismo donante que en las **Figuras 12A-12D**. **DART-A**: ▲; **DART 1 de control**: ▼.

- 5 Las **Figuras 15A-15B** muestran los niveles intracelulares de la tinción de granzima B (**Figura 15A**) y de perforina (**Figura 15B**) en linfocitos T humanos CD4+ y CD8+ después de la incubación con células diana Raji/GF y **DART-A** o **DART 1 de control** a concentraciones variables durante 24 horas a una relación E:T de 10:1.
- 10 Las **Figuras 16A y 16B** muestran la proliferación de linfocitos T humanos marcadas con CFSE mediante análisis FACS después del cultivo conjunto con células diana HBL-2 en una relación E:T de 10:1 en presencia de **DART-A** o **DART 1 de control** a 200 ng/ml durante 24 horas (**Figura 16A**) o 72 horas (**Figura 16B**). Se muestran los perfiles de tinción después del cultivo conjunto con células HBL-2 en presencia de **DART-A** (líneas negras) o en presencia de **DART 1 de control** (relleno gris).
- 15 La **Figura 17** muestra la inhibición del crecimiento tumoral por la molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) en ratones implantados con células tumorales HBL-2 en presencia de linfocitos T humanos activados. A ratones hembra no obesos diabéticos/inmunodeficiencia combinada grave (NOD/SCID) (n = 8/grupo) se les implantaron por vía subcutánea (SC) células tumorales HBL-2 + linfocitos T humanos activados el Día 0, seguido de tratamiento con control de vehículo, **DART 1 de control** o **DART-A**, los Días 0-3 para un total de 4 dosis, administradas IV. Las linfocitos T humanos y las células HBL-2 se incubaron en una relación de 1:5 (1 x 10<sup>6</sup> y 5 x 10<sup>6</sup> células, respectivamente). El volumen tumoral se muestra como la media del grupo ± ETM.
- 20 La **Figura 18** muestra la inhibición del crecimiento tumoral por la molécula biespecífica de CD19 x CD3 (**DART-A**) en ratones implantados con células tumorales Raji en presencia de linfocitos T humanos activados. A ratones hembra NOD/SCID (n = 8/grupo) se les implantaron SC células tumorales Raji + linfocitos T humanos activados el Día 0, seguido de tratamiento con control de vehículo, **DART 1 de control** o **DART-A**, los Días 0-3 para un total de 4 dosis administradas IV. Los linfocitos T humanos y las células Raji se incubaron en una relación de 1:5 (1 x 10<sup>6</sup> y 5 x 10<sup>6</sup> células, respectivamente). El volumen tumoral se muestra como la media del grupo ± ETM.
- 25 Las **Figuras 19A-19B** muestran el cambio en el volumen tumoral en el tiempo en ratones implantados con células tumorales HBL-2. **Figura 19A**: A ratones hembra NSG B2m-/ (n = 8 por grupo) se les implantaron por vía intradérmica (ID) células tumorales HBL-2 (5 x 10<sup>6</sup>), el Día 0. El Día 4, a los ratones se les implantaron PBMC (5 x 10<sup>7</sup>) por vía intraperitoneal (IP). A continuación, se trató a los ratones por vía intravenosa (IV) con vehículo, **DART 1 de control** o el **DART-A** biespecífico de CD19 x CD3 como se indica (ver flechas de Rx). El volumen tumoral se muestra como una media de grupo ± ETM. **Figura 19B**: A ratones hembra NSG B2m-/ (n = 8 por grupo) se les implantaron por vía intradérmica (ID) células tumorales HBL-2 (5 x 10<sup>6</sup>), el Día 0. El Día 4, a los ratones se les implantaron PBMC (5 x 10<sup>7</sup>) por vía intraperitoneal (IP). A continuación, se trató a los ratones por vía intravenosa (IV) con vehículo, **DART 1 de control** o el **DART-A** biespecífico de CD19 x CD3 como se indica (ver flechas de Rx). El volumen tumoral se muestra como una media de grupo ± ETM.
- 30 Las **Figuras 20A-20B** muestran los niveles de linfocitos B circulantes en el tiempo en monos cinomolgos después de la administración IV de hasta 4 ciclos de dosis semanales crecientes del **DART-A** biespecífico de CD19 x CD3. A los monos cinomolgos en el Grupo 1 (n = 4) se les trató con vehículo → 0,5 → 5 → 50 → 50 µg/kg de **DART-A** administrado IV los Días 1, 8, 15, 22 y 29 (indicado por líneas verticales punteadas) (**Figura 20A**). A los monos cinomolgos en el Grupo 2 (n = 4) se les trató con vehículo → 2 → 10 → 100 → 100 µg/kg de **DART-A** administrado IV los Días 1, 8, 15, 22 y 29 (indicado por líneas verticales punteadas) (**Figura 20B**). Se muestran los datos para cada mono cinomolgo.
- 35 Las **Figuras 21A-21D** muestran los niveles de linfocitos B circulantes en el tiempo en monos cinomolgos después de la administración IV de hasta 3 ciclos de dosis fijas semanales o de hasta 5 ciclos de dosis fijas cada 3 días de **DART-A**. A los monos cinomolgos en los Grupos 3-5 (n = 2 por grupo) se les trató con **DART-A** biespecífico de CD19 x CD3. El Grupo 3 (**Figura 21A**) recibió 5 ng/kg de **DART-A**; el Grupo 4 (**Figura 21B**) recibió 50 ng/kg de **DART-A**; y el Grupo 5 (**Figura 21C**) recibió 500 ng/kg de **DART-A**. Se administró IV DART-A los Días 1, 8 y 15 (indicado por líneas verticales punteadas). A los monos cinomolgos en el Grupo 6 (n = 2) (**Figura 21D**) se les trató con 500 ng/kg de **DART-A** administrado IV los Días 1, 4, 8, 11 y 15 (indicado por líneas verticales punteadas). Se muestran los datos para cada mono cinomolgo.
- 40 La **Figura 22** muestra el análisis farmacocinético (PK) de **DART-A** de ratones transgénicos de FcRn humano. mAb 1, mAb 2 y mAb 3 son anticuerpos IgG1 humanizados irrelevantes empleados como control para permitir la determinación de la semivida típica del anticuerpo en los animales transgénicos.
- 45 La **Figura 23** muestra las curvas de supervivencia en un modelo de leucemia de células Raji-luc diseminada en ratones reconstituidos con PBMC humanas después del tratamiento con 500 µg/kg de **DART-A** (■), 500 µg/kg de **DART 1 de control** (▲) o control de vehículo (●).
- 50 La **Figura 24** muestra las curvas de supervivencia en un modelo de leucemia de células Raji-luc diseminada en
- 55

ratones reconstituidos con PBMC humanas después del tratamiento con 500 µg/kg (•), 100 µg/kg (■), 20 µg/kg (◦), 4 µg/kg (▲), 0,8 µg/kg (▼) o 0,16 µg/kg (□) de **DART-a**, 500 mg/kg (Δ) de **DART 1 de control** o control de vehículo (○).

5 La **Figura 25** muestra las curvas de supervivencia en un modelo de linfoma de células Raji.luc en ratones reconstituidos con PBMC humanas después del tratamiento con 0,5 mg/kg de **DART-A** (▲), 0,1 mg/kg de **DART-A** (■) o control de vehículo (•).

10 La **Figura 26** muestra las curvas de supervivencia en un modelo de linfoma de células Raji.luc en ratones reconstituidos con PBMC humanas después del tratamiento con 500 µg/kg (■), 100 µg/kg (▲), 20 µg/kg (▼), 4 µg/kg (○), 0,8 µg/kg (□) o 0,16 µg/kg (Δ) de **DART-A**, 0,1 mg/kg de **DART 1 de control** (◦) o control de vehículo (•).

15 La **Figura 27** muestra el perfil de concentración sérica-tiempo del **DART-A** en un mono cinomolgo que recibió una dosis de 10 µg/kg de **DART-A**.

15 La **Figura 28** muestra el número medio ± ETM de células CD45+/CD20+/µl determinado por citometría de flujo para un día de estudio y un grupo. Las líneas discontinuas verticales en los Días 8, 15, 22 y 29 indican cada dosis (D) de **DART-A** por infusión IV de 2 horas para animales de los Grupos 2-5; si bien los animales del Grupo 1 continuaron recibiendo el vehículo de control. El eje x que indica el día de estudio se divide en 3 segmentos que cubren los Días -7 a -1, el Día 0 a 63 y los Días 64-121.

20 Las **Figuras 29A-29I** muestran análisis FACS representativos de linfocitos B malignos (CD20+/CD5+) (**Figuras 29A-29C**), linfocitos T (CD4+ o CD8+) (**Figuras 29D-29E**) y activación de linfocitos T (CD25 en linfocitos T CD4+ (**Figuras 29F-29G**) o CD8+ (**Figuras 29H-29I**)) en PBMC de LLC (E:T = 1:23) después de no aplicar tratamiento (sin tratamiento) (**Figura 29A**), con tratamiento durante 6 días de **DART-A** (**Figuras 29C, 29E, 29G y 29I**) o de **DART 1 de control** (**Figuras 29B, 29D, 29F y 29H**).

#### Descripción detallada:

30 Se describen diacuerpos monovalentes biespecíficos que comprenden dos cadenas polipeptídicas y que poseen un sitio de unión específico para un epítopo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítopo de CD3 (es decir, un "diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3"). Lo más preferentemente, tales diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 están compuestos por tres cadenas polipeptídicas y poseen un sitio de unión específico para un epítopo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítopo de CD3 y comprenden adicionalmente un dominio Fc de inmunoglobulina (es decir, un "diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3"). Los diacuerpos monovalentes biespecíficos y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente descripción son capaces de unirse simultáneamente a CD19 y CD3. También se describen composiciones farmacéuticas que contienen tales diacuerpos monovalentes biespecíficos o tales diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos. También se describen métodos para el uso de dichos diacuerpos en el tratamiento de enfermedades, en particular, en neoplasias hematológicas.

#### A. Anticuerpos y otras moléculas de unión

##### 1. Anticuerpos

45 Como se utiliza en el presente documento, el término "**anticuerpos**" abarca no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también mutantes de los mismos, variantes de origen natural, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo con un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados y anticuerpos químéricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida. A lo largo de la presente solicitud, la numeración de los restos de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos está de acuerdo con el índice EU de Kabat *et al.* (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Publicación de los Institutos Nacionales de la Salud N.º 91-3242. Como se utiliza en el presente documento, un "fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo" es una porción de un anticuerpo que posee al menos un sitio de reconocimiento de antígeno. Como se utiliza en el presente documento, el término abarca fragmentos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> Fv) y cadena única (scFv).

60 La expresión "**anticuerpo monoclonal**" se refiere a una población homogénea de anticuerpos en donde el anticuerpo monoclonal comprende aminoácidos (naturales y no naturales) que están implicados en la unión selectiva de un antígeno. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. La expresión "**anticuerpo monoclonal**" abarca no solo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> Fv), monocatenario (scFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales químéricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida y la capacidad de unión a un antígeno. No se pretende que esta expresión esté limitada con respecto a la fuente del anticuerpo o la

forma en que este se fabrica (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). La expresión incluye inmunoglobulinas completas, así como los fragmentos, etc., descritos anteriormente en la definición de "anticuerpo". Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos monoclonales. Un método que puede emplearse es el método de Kohler, G. *et al.* (1975) "Continuous Cultures Of 5 Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity", *Nature* 256:495-497 o una modificación del mismo. Normalmente, los anticuerpos monoclonales se desarrollan en ratones, ratas o conejos. Los anticuerpos se producen inmunizando a un animal con una cantidad inmunogénica de células, extractos celulares o preparaciones de proteínas 10 que contienen el epítopo deseado. El inmunógeno puede ser, pero sin limitación, células primarias, líneas celulares cultivadas, células cancerosas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos o tejido. Las células utilizadas para la inmunización se pueden cultivar durante un período de tiempo (por ejemplo, al menos 24 horas) antes de su uso como inmunógeno. Las células se pueden usar como inmunógenos por sí mismas o en combinación con un adyuvante no desnaturalizante, tal como Ribi. En general, las células deben mantenerse intactas y preferentemente viables cuando 15 se usan como inmunógenos. Las células intactas pueden permitir que el animal inmunizado detecte mejor los antígenos que las células rotas. La utilización de adyuvantes desnaturalizantes o agresivos, por ejemplo, adyuvante de Freud, puede romper las células y por tanto se desaconseja. El inmunógeno se puede administrar varias veces a 20 intervalos periódicos, tales como cada quince días o cada semana o puede administrarse de tal manera que se mantenga la viabilidad en el animal (por ejemplo, en un tejido recombinante). Como alternativa, los anticuerpos monoclonales existentes y cualquier otro anticuerpo equivalente que sea inmunoespecífico para un epítopo patógeno deseado se pueden secuenciar y producir de forma recombinante por cualquier medio conocido en la técnica. En una descripción, tal anticuerpo se secuencia y la secuencia polinucleotídica se clona luego en un vector para su expresión 25 o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped posteriormente puede expandirse y congelarse para su uso futuro. La secuencia de polinucleótidos de tales anticuerpos puede usarse para la manipulación genética para generar las moléculas biespecíficas de la descripción, así como un anticuerpo químico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo canonizado, para mejorar la afinidad u otras características del anticuerpo. El principio general para humanizar un 30 anticuerpo implica conservar la secuencia básica de la porción del anticuerpo que se une al antígeno, mientras se intercambia el resto no humano del anticuerpo con secuencias de anticuerpos humanos. Hay cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos predicha de los dominios variables ligeros y pesados del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado o el anticuerpo caninizado, es decir, decidir qué región marco del anticuerpo usar durante el proceso de humanización o canonización (3) utilizar las metodologías/técnicas de humanización o caninización reales y (4) realizar la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; y 6.331.415.

## 35 2. Anticuerpos biespecíficos, diacuerpos multiespecíficos y diacuerpos DART™

La provisión de "**diacuerpos**" no monoespecíficos proporciona una ventaja significativa sobre los anticuerpos: la capacidad de coligar y colocarizar células que expresan diferentes epítopos. Por tanto, los diacuerpos bivalentes tienen una amplia gama de aplicaciones entre las que se incluyen la terapia y el inmunodiagnóstico. La bivalencia permite 40 tener gran flexibilidad en el diseño y la modificación por ingeniería genética del diacuerpo en diversas aplicaciones, proporcionando mejor avidez hacia los antígenos multiméricos, la reticulación de diferentes antígenos y el direccionamiento dirigido a tipos específicos de células basándose en la presencia de los dos antígenos diana. Debido a su mayor valencia, a sus bajas constantes de disociación y a su rápido aclaramiento de la circulación (para diacuerpos de pequeño tamaño, en o por debajo de ~50 kDa), las moléculas de diacuerpo conocidas en la técnica 45 también han demostrado una utilidad particular en el campo de la generación de imágenes de tumores (Fitzgerald *et al.* (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*", *Protein Eng.* 10:1221). Tiene una importancia particular la coligación de diferentes células, por ejemplo, el entrecruzamiento de linfocitos T citotóxicos con células tumorales (Staerz *et al.* (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells", *Nature* 314:628-631 y Holliger *et al.* (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated 50 By A Bispecific Diabody", *Protein Eng.* 9:299-305).

Los dominios de unión al epítopo de diacuerpos también pueden dirigirse a un determinante de superficie de un linfocito B, tales como CD19, CD20, CD22, CD30, CD37, CD40 y CD74 (Moore, P.A. *et al.* (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", *Blood* 117(17):4542-4551; 55 Cheson, B.D. *et al.* (2008) "Monoclonal Antibody Therapy For B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma", *N. Engl. J. Med.* 359(6):613-626; Castillo, J. *et al.* (2008) "Newer monoclonal antibodies for hematological malignancies", *Exp. Hematol.* 36(7):755-768. En muchos estudios, también se observó que la unión del diacuerpo a determinantes de células efectoras, por ejemplo, a receptores Fc (FcγR), activa 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) 60 "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; documento WO 2006/113665; documento WO 2008/157379; documento WO 2010/080538; documento WO 2012/018687; documento WO 2012/162068). Normalmente, la activación de células efectoras se desencadena por la unión de un anticuerpo unido a un antígeno a una célula efectora a través de la interacción Fc-FcγR; por tanto, en este sentido, las moléculas 65 de diacuerpo pueden presentar una funcionalidad similar a la de Ig independientemente de si comprenden un dominio Fc (por ejemplo, como se analiza en cualquier ensayo de la función efectora conocido en la técnica o ilustrado en el

presente documento (por ejemplo, ensayo de ADCC)). Mediante el entrecruzamiento de células tumorales y efectoras, el diacuerpo no solo lleva la célula efectora a las proximidades de las células tumorales, sino que conduce a la destrucción eficaz del tumor (véase, por ejemplo, Cao *et al.* (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics", *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-197).

- 5 Sin embargo, las ventajas anteriores tienen un coste notable. La formación de tales diacuerpos no monoespecíficos requiere el ensamblaje exitoso de dos o más polipéptidos distintos y diferentes (es decir, tal formación requiere que los diacuerpos se formen mediante la heterodimerización de diferentes especies de cadenas polipeptídicas). Este hecho contrasta con los diacuerpos monoespecíficos, que se forman mediante la homodimerización de cadenas polipeptídicas idénticas. Debido a que se deben proporcionar al menos dos polipéptidos diferentes (es decir, dos especies de polipéptidos) para formar un diacuerpo no monoespecífico y debido a que la homodimerización de dichos polipéptidos conduce a moléculas inactivas (Takemura, S. *et al.* (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8):583-588), la producción de dichos polipéptidos debe lograrse de tal manera que se evite la unión covalente entre polipéptidos de la misma especie (Takemura, S. *et al.* (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8): 583-588). Por tanto, la técnica ha enseñado la asociación no covalente de tales polipéptidos (véanse, por ejemplo, Olafsen *et al.* (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Asano *et al.* (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", *Resumen 3P-683, J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. *et al.* (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8): 583-588; Lu, D. *et al.* (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", *J. Biol. Chem.* 280(20): 19665-19672).
- 10 25 Sin embargo, la técnica ha reconocido que los diacuerpos 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).
- 15 30 Frente a este desafío, la técnica ha logrado desarrollar diacuerpos estables, heterodiméricos no monoespecíficos unidos covalentemente, denominados **DART™** (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2013-0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; la publicación de patente europea n.º EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y las publicaciones del PCT n.º WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; y Moore, P.A. *et al.* (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell 35 Killing Of B-Cell Lymphoma", *Blood* 117(17):4542-4551; Veri, M.C. *et al.* (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold", *Arthritis Rheum.* 62(7): 1933-1943; Johnson, S. *et al.* (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And *in vivo* B-Cell Depletion", *J. Mol. Biol.* 399(3):436-449). Tales diacuerpos comprenden dos o más polipéptidos que forman complejos covalentemente e implican modificar por ingeniería genética uno o más restos de cisteína en cada una de las especies polipeptídicas empleadas. Por ejemplo, se ha demostrado que la adición de un resto de cisteína al extremo C terminal de estas construcciones permite que se formen enlaces disulfuro entre las cadenas polipeptídicas, estabilizándose el heterodímero resultante sin interferir con las características de unión de la molécula bivalente.
- 40 45 Cada uno de los dos polipéptidos del ejemplo más sencillo de DART™ comprende tres dominios (**Figura comparativa 1**). El primer polipéptido comprende: (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la primera inmunoglobulina (VL1), (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) y (iii) un tercer dominio que sirve para promover la heterodimerización con el segundo polipéptido y para unir covalentemente el primer polipéptido al segundo polipéptido del diacuerpo. El segundo polipéptido contiene un primer dominio complementario (un dominio VL2), un segundo dominio complementario (un dominio VH1) y un tercer dominio que forma complejo con el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica para promover la heterodimerización y la unión covalente con la primera cadena polipeptídica. Estas moléculas son estables, potentes y tienen la capacidad de unirse simultáneamente a dos o más antígenos. Son capaces de promover la destrucción redirigida mediada por linfocitos T de células que expresan antígenos diana.

50 55 En una descripción, los terceros dominios de los polipéptidos primero y segundo contienen, cada uno, un resto de cisteína, que sirve para unir los polipéptidos entre sí mediante un enlace disulfuro. El tercer dominio de uno o ambos polipéptidos puede poseer adicionalmente la secuencia de un dominio CH2-CH3, de tal manera que la formación de complejos de los polipéptidos de diacuerpo forma un dominio Fc que es capaz de unirse al receptor Fc de células (tales como linfocitos B, células dendríticas, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos) (**Figuras 2A-2B**). Se han descrito muchas variaciones de estas moléculas (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2013-0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; la publicación de patente europea n.º EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y las publicaciones del PCT n.º WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Estos DART portadores de Fc pueden comprender tres cadenas polipeptídicas. El primer polipéptido de tal diacuerpo contiene tres dominios: (i) un dominio que contiene VL1,

5 (ii) un dominio que contiene VH2, (iii) un dominio que promueve la heterodimerización y el enlace covalente con la primera cadena polipeptídica del diacuerpo y (iv) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. La segunda cadena polipeptídica de tal DART™ contiene: (i) un dominio que contiene VL2, (ii) un dominio que contiene VH1 y (iii) un dominio que promueve la heterodimerización y que forma enlaces covalentes con la primera cadena polipeptídica del diacuerpo. El tercer polipéptido de tal DART™ comprende una secuencia CH2-CH3. Por tanto, la primera y 10 segundas cadenas polipeptídicas de dicho DART™ se asocian entre sí para formar un sitio de unión VL1/VH1 que es capaz de unirse al epítopo, así como un sitio de unión VL2/VH2 que es capaz de unirse al segundo epítopo. El primer y segundo polipéptidos están unidos entre sí a través de un enlace disulfuro en el que están implicados restos de cisteína en sus terceros dominios respectivos. De manera notable, la primera y la tercera cadenas polipeptídicas forman un complejo entre sí para formar un dominio Fc que se estabiliza mediante un enlace disulfuro. Tales diacuerpos tienen una potencia mejorada. Tales DART™ que portan Fc pueden tener dos orientaciones (**Tabla 1**):

Tabla 1		
Primera orientación	3 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-COOH
	1 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-Dominio Promotor de Heterodímeros-CH2-CH3-COOH
	2 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-Dominio Promotor de Heterodímeros-COOH
Segunda orientación	3 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-COOH
	1 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-VL1-VH2-Dominio Promotor de Heterodímeros-COOH
	2 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-Dominio Promotor de Heterodímeros-COOH

#### B. Diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 preferidos

15 También se describen diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 que son capaces de unirse simultáneamente a CD19 y CD3 y los usos de tales moléculas en el tratamiento de neoplasias hematológicas. Aunque los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 no optimizados son completamente funcionales, análogos 20 a las mejoras obtenidas en la expresión génica a través de la optimización de codones (véase, por ejemplo, Grosjean, H. *et al.* (1982) "Preferential Codon Usage In Prokaryotic Genes: The Optimal Codon-Anticodon Interaction Energy And The Selective Codon Usage In Efficiently Expressed Genes" *Gene* 18(3): 199-209), es posible mejorar aún más la estabilidad y/o la función de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 modificando o refinando sus secuencias.

25 Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 preferidos de la presente descripción son los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 que están compuestos por tres cadenas polipeptídicas que se asocian entre sí para formar un sitio de unión específico para un epítopo de CD19 y un sitio de unión específico para un epítopo de CD3 (véanse, **Figuras 2A-2B**), para poder unirse simultáneamente a CD19 y a CD3. Por tanto, tales diacuerpos 30 se unen a un "primer antígeno", que puede ser CD3 o CD19 y a un "segundo antígeno", que es CD19 cuando el primer epítopo es CD3 y es CD3 cuando el primer epítopo es CD19.

35 Preferentemente, como se muestra en la **Figura 2A**, la primera de tales tres cadenas polipeptídicas contendrá, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N terminal, el dominio de unión a antígeno de un dominio variable de cadena ligera (**LV**) de un "primer" antígeno (CD3 o CD19), el dominio de unión a antígeno de un dominio variable de cadena pesada (**VH**) de un segundo antígeno (CD19, si el primer antígeno era CD3; CD3, si el primer antígeno era CD19), un dominio promotor de heterodímeros y un extremo C terminal. Un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 1**) separa el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena ligera del dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada. Preferentemente, el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada está unido al dominio promotor de heterodímeros mediante un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 2**). 40 En el caso de un diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3, el extremo C terminal del dominio promotor de heterodímeros está unido a los dominios CH2-CH3 de una región Fc ("dominio Fc") mediante un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 3**) o por un péptido espaciador-enlazador intermedio (**Espaciador-Enlazador 3**). Lo más preferentemente, la primera de las tres cadenas polipeptídicas contendrá por tanto, en la dirección de N-terminal a C-terminal: VL<sub>Primer</sub> Antígeno - Enlazador 1 - VH<sub>Segundo</sub> Antígeno - Enlazador 2 - Dominio promotor de heterodímeros - Espaciador-Enlazador 3 - Dominio Fc.

45 Como alternativa, como se muestra en la **Figura 2B**, la primera de tales tres cadenas polipeptídicas contendrá, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N terminal, **Enlazador 3**, los dominios CH2-CH3 de una región Fc ("Dominio Fc"), un péptido espaciador intermedio (**Enlazador 4**), que tiene, por ejemplo la secuencia de aminoácidos: 50 APSSS (**SEQ ID NO: 47**) o la secuencia de aminoácidos APSSSPME (**SEQ ID NO: 48**), el dominio de unión a antígeno de un dominio variable de cadena ligera (**LV**) del primer antígeno (ya sea CD3 o CD19), el dominio de unión a antígeno de un dominio variable de cadena pesada (**VH**) del segundo antígeno (CD19, si el primer antígeno fue CD3; CD3, si el primer antígeno era CD19), un dominio promotor de heterodímeros y un extremo C terminal. Un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 1**) separa el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena ligera del dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada. Preferentemente, el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada está unido al dominio promotor de heterodímeros mediante un péptido enlazador 55

intermedio (**Enlazador 2**). Lo más preferentemente, la primera de las tres cadenas polipeptídicas contendrá por tanto, en la dirección de N-terminal a C-terminal: **Enlazador 3** - Dominio Fc - **Enlazador 4** - LV<sub>Primero</sub> Antígeno - Enlazador 1 - VH<sub>Segundo</sub> Antígeno - Enlazador 2 - Dominio promotor de heterodímeros.

- 5 Preferentemente, la segunda de estas tres cadenas polipeptídicas contendrá, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N terminal, el dominio de unión a antígeno de un dominio variable de cadena ligera (**LV**) del segundo antígeno, el dominio de unión a antígeno de un dominio variable de cadena pesada (**VH**) del primer antígeno, un dominio promotor de heterodímeros y un extremo C terminal. Un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 1**) separa el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena ligera del dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada. Preferentemente, el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada está unido al dominio promotor de heterodímeros mediante un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 2**). Lo más preferentemente, la segunda de las tres cadenas polipeptídicas contendrá, por tanto, en la dirección de N-terminal a C-terminal: VL<sub>Segundo</sub> Antígeno - Enlazador 1 - VH<sub>Primero</sub> Antígeno - Enlazador 2 - Dominio promotor de heterodímeros.
- 10 15 Preferentemente, la tercera de tales tres cadenas polipeptídicas contendrá el péptido enlazador (**Enlazador 3**) y los dominios CH2-CH3 de una región Fc ("Dominio Fc").

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 sitio de unión a antígeno funcional que es específico para el primer antígeno (es decir, CD19 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 que es específico para la segundo antígeno (es decir, CD3 o CD19, dependiendo de la identidad del primer antígeno). Por tanto, 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 cadena polipeptídica se coordina, de manera que las dos cadenas polipeptídicas comprenden colectivamente dominios de unión a antígeno de dominios variables de cadena ligera y pesada capaces de unirse a CD19 y CD3.

30 **1. Enlazadores preferidos**

Lo más preferentemente, la longitud del **Enlazador 1**, que separa tales dominios VL y VH de una cadena polipeptídica se selecciona para evitar sustancial o completamente que dichos dominios VL y VH se unan entre sí. Por 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 intermedio preferido (Enlazador 1) tiene la secuencia (**SEQ ID NO: 1**): GGGSGGGG.

40 El propósito del **Enlazador 2** es separar el dominio VH de una cadena polipeptídica del dominio promotor de heterodímeros de esa cadena polipeptídica. Puede utilizarse cualquiera de una variedad de enlazadores para el fin del **Enlazador 2**. Una secuencia preferida para tal **Enlazador 2** tiene la secuencia de aminoácidos: ASTKG (**SEQ ID NO: 2**), que se deriva del dominio IgG CH1 o GGCGGG (**SEQ ID NO: 3**), que posee un resto de cisteína que puede usarse para unir covalentemente la primera y la segunda cadena polipeptídica entre sí a través de un enlace disulfuro. Ya que el **enlazador 2**, ASTKG (**SEQ ID NO: 2**) no posee tal cisteína, el uso de tal **Enlazador 2** se asocia preferentemente con el uso de un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína, tal como la espiral E de la **SEQ ID NO: 12** o la espiral K de la **SEQ ID NO: 13** (vea abajo).

45 El propósito del **Enlazador 3** es separar el dominio promotor de heterodímeros de una cadena polipeptídica del dominio Fc de esa cadena polipeptídica. Puede utilizarse cualquiera de una variedad de enlazadores para el fin del **Enlazador 3**. Una secuencia preferida para tal **Enlazador 3** tiene la secuencia de aminoácidos: DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO: 4**). Una secuencia preferida para el **Espaciador-enlazador 3** tiene la secuencia de aminoácidos: GGGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO: 5**).

55 **2. Dominios promotores de heterodímeros preferidos**

50 La formación de heterodímeros de la primera y segunda cadenas polipeptídicas puede ser impulsada por la inclusión de dominios promotores de heterodímeros. Dichos dominios incluyen GVEPKSC (**SEQ ID NO: 6**) o VEPKSC (**SEQ ID NÚM: 7**) en una cadena polipeptídica y GFNRGEC (**SEQ ID NO: 8**) o FNRGEC (**SEQ ID NO: 9**) en la otra cadena polipeptídica (US2007/0004909).

60 65 Más preferentemente, sin embargo, los dominios promotores de heterodímeros de la presente descripción están formados por uno, dos, tres o cuatro dominios de espiral repetidos en tándem de carga opuesta que comprenden una secuencia de al menos seis, al menos siete o al menos ocho restos de aminoácidos cargados (Apostolovic, B. *et al.* (2008) "pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil", *Biomacromolecules* 9:3173-3180; Arndt, K.M. *et al.* (2001) "Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain", *J. Molec. Biol.* 312:221-228; Arndt, K.M. *et al.* (2002) "Comparison of *In Vivo*

Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils", Structure 10:1235-1248; Boucher, C. *et al.* (2010) "Protein Detection By Western Blot Via Coiled-Coil Interactions", Analytical Biochemistry 399:138-140; Cachia, P.J. *et al.* (2004) "Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy", J. Mol. Recognit. 17:540-557; De Crescenzo, G.D. *et al.* (2003) "RealTime Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding", Biochemistry 42:1754-1763; Fernandez-Rodriguez, J. *et al.* (2012) "Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag", Protein Science 21:511-519; Ghosh, T.S. *et al.* (2009) "End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures", Acta Crystallographica D65:1032-1041; Grigoryan, G. *et al.* (2008) "Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions", Curr. Opin. Struc. Biol. 18:477-483; Litowski, J.R. *et al.* (2002) "Designing Heterodimeric Two-Stranded  $\alpha$ -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And  $\alpha$ -Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity", J. Biol. Chem. 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. *et al.* (2012) "The d'-d-d' Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'-a-a' Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif", J. Amer. Chem. Soc. 134(5):2626-2633; Straussman, R. *et al.* (2007) "Kinking the Coiled Coil - Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface", J. Molec. Biol. 366:1232-1242; Tripet, B. *et al.* (2002) "Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance", J. Molec. Biol. 323:345-362; Woolfson, D.N. (2005) "The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies", Adv. Prot. Chem. 70:79-112; Zeng, Y. *et al.* (2008) "A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism", J. Gene Med. 10:355-367).

Dichos dominios de espiral repetidos pueden ser repeticiones exactas o pueden tener sustituciones. Por ejemplo, el dominio promotor de heterodímeros de la primera cadena polipeptídica puede comprender una secuencia de ocho restos de aminoácidos cargados negativamente y el dominio promotor de heterodímeros de la segunda cadena polipeptídica puede comprender una secuencia de ocho restos de aminoácidos cargados positivamente (o viceversa). Es indiferente qué espiral se proporciona a la primera o segunda cadenas polipeptídicas, siempre que se utilice una espiral de carga opuesta para la otra cadena polipeptídica. Sin embargo, un diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 preferido de la presente descripción tiene una primera cadena polipeptídica que tiene una espiral cargada 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 positivamente es preferentemente lisina y/o el aminoácido cargado negativamente es preferentemente ácido glutámico. Es posible que se emplee un único dominio promotor de heterodímeros (ya que dicho dominio inhibirá la homodimerización y por tanto promoverá la heterodimerización), sin embargo, se prefiere que tanto la primera como la segunda cadena polipeptídica de los diacuerpos de la presente descripción contengan dominios promotores de heterodímeros.

En una descripción preferida, uno de los dominios promotores de heterodímeros comprenderá cuatro dominios helicoidales de "espiral E" en tándem (**SEQ ID NO: 10: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK**), cuyos restos de glutamato formarán una carga negativa a pH 7, mientras que el otro de los dominios promotores de heterodímeros comprenderá cuatro dominios de "espiral K" en tándem (**SEQ ID NO: 11: KVAALK-EK-KVAALE-KVAALK-EK-KVAALK-EK**), cuyos restos de lisina formarán una carga positiva a pH 7. La presencia de dichos dominios cargados promueve la asociación entre el primer y el segundo polipéptidos y por tanto, fomenta la heterodimerización. Se prefiere especialmente un dominio promotor de heterodímeros en el que uno de los cuatro dominios helicoidales de "espiral E" en tándem de **SEQ ID NO: 10** se haya modificado para contener un resto de cisteína: **EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK** (**SEQ ID NO: 12**). Asimismo, se prefiere especialmente un dominio promotor de heterodímeros en el que uno de los cuatro dominios helicoidales de "espiral K" en tándem de **SEQ ID NO: 11** se haya modificado para contener un resto de cisteína: **KVAACKE-KVAALK-EK-KVAALK-EK-KVAALK-EK** (**SEQ ID NO: 13**).

### 3. Enlace covalente de las cadenas polipeptídicas

Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción están modificados por ingeniería genética de manera que sus cadenas polipeptídicas primera y segunda se unen covalentemente entre sí a través de uno o más restos de cisteína colocados a lo largo de su longitud. Tales restos de cisteína pueden introducirse en el enlazador intermedio que separa los dominios VL y VH de los polipéptidos. Como alternativa, el **Enlazador 2** puede contener un resto de cisteína. Adicionalmente o como alternativa, el **Enlazador 3** puede contener un resto de cisteína, como en la **SEQ ID NO: 4** o la **SEQ ID NO: 5**. Lo más preferentemente, uno o más dominios en espiral del dominio promotor de heterodímeros se sustituirá(n) para contener un resto de cisteína, como en la **SEQ ID NO: 12** o la **SEQ ID NO: 13**.

En descripciones particulares, los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción pueden tener además un dominio de unión a albúmina para prolongar la semivida *en vivo*.

### 4. Dominios Fc preferidos

El dominio Fc de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción puede ser una región Fc completa (por ejemplo, una región Fc de IgG completa) o solo un fragmento de una región Fc completa. Aunque el dominio Fc de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente descripción puede poseer la

capacidad de unirse a uno o más receptores Fc (por ejemplo, Fc<sub>y</sub>R), más preferentemente, tal dominio Fc provocará una unión alterada a Fc<sub>y</sub>RIA (CD64), Fc<sub>y</sub>RIIA (CD32A), Fc<sub>y</sub>RIIB (CD32B), Fc<sub>y</sub>RIIA (CD16a) o Fc<sub>y</sub>RIIB (CD16b) (con respecto a la unión que presenta un dominio Fc de tipo silvestre) 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 5 presente descripción puede incluir parte o la totalidad del dominio CH2 y/o parte o la totalidad del dominio CH3 de una región Fc completa o puede comprender una variante de CH2 y/o una secuencia de CH3 variante (que puede incluir, por ejemplo, una o más inserciones y/o una o más delecciones con respecto a los dominios CH2 o CH3 de una región Fc completa). El dominio Fc de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente descripción puede 10 comprender porciones de polipéptido no Fc o puede comprender porciones de regiones Fc no completas de forma natural o puede comprender orientaciones no naturales de dominios CH2 y/o CH3 (tales como, por ejemplo, dos dominios CH2 o dos dominios CH3 o en la dirección N-terminal a C-terminal, un dominio CH3 unido a un dominio CH2, etc.).

15 En una descripción preferida, la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción comprenden cada uno dominios CH2-CH3 que forman complejos entre sí para formar un dominio Fc de inmunoglobulina (IgG). La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG1 humana es (**SEQ ID NO: 14**):

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSCHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
WESNGQOPENN YKTTPPVLDs DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
ALHNHYTQKS LSLSPGK

20 Por tanto, los dominios CH2 y/o CH3 de la primera y tercera cadenas polipeptídicas pueden estar compuestos por la **SEQ ID NO: 14** o una variante de la misma.

25 En particular, se prefiere que los dominios CH2-CH3 de la primera y tercera cadenas polipeptídicas de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción muestren una unión reducida (o sustancialmente nula) a Fc<sub>y</sub>RIA (CD64), Fc<sub>y</sub>RIIA (CD32A), Fc<sub>y</sub>RIIB (CD32B), Fc<sub>y</sub>RIIA (CD16a) o Fc<sub>y</sub>RIIB (CD16b) (en relación con la unión presentada por la región Fc de tipo silvestre (**SEQ ID NO: 14**)). Las variantes de Fc y las 30 formas mutantes capaces de mediar tal unión alterada 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, la patente de EE. UU. n.º 5.624.821). En una descripción preferida, el dominio CH2-CH3 de la primera y/o tercera cadena polipeptídica de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la 35 presente descripción incluyen una sustitución en la posición 234 con alanina y en la 235 con alanina.

40 Los dominios CH2 y/o CH3 de las cadenas polipeptídicas primera y tercera no necesitan ser idénticos en secuencia y ventajosamente se modifican para fomentar la formación de complejos entre las dos cadenas polipeptídicas. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos (preferentemente una sustitución con un aminoácido que comprende un grupo lateral voluminoso que forma un "botón", por ejemplo, triptófano) se puede introducir en el dominio CH2 o CH3 de manera que la interferencia estérica evitará la interacción con un dominio mutado de manera similar y obligará al dominio mutado a emparejarse con un dominio en el que se haya modificado por ingeniería genética una mutación complementaria o adaptativa, es decir, "el ojal" (por ejemplo, una sustitución con glicina). Tales conjuntos de 45 mutaciones pueden modificarse por ingeniería genética en cualquier par de polipéptidos que comprenda la molécula de diacuerpo y además, modificarse por ingeniería genética en cualquier porción de las cadenas polipeptídicas de dicho par. Los métodos de modificación por ingeniería de proteínas para favorecer la heterodimerización frente a la homodimerización son bien conocidos en la técnica, en particular, con respecto a la modificación por ingeniería de moléculas similares a inmunoglobulina y están englobados en el presente documento (véanse, 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 y Xie *et al.* (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis", J. Immunol. Methods 296:95-101). 50 Preferentemente, el "botón" se modifica por ingeniería genética en los dominios CH2-CH3 de la primera cadena polipeptídica y el "ojal" se modifica por ingeniería genética en los dominios CH2-CH3 de la tercera cadena polipeptídica. Por tanto, el "botón" ayudará a impedir que la primera cadena polipeptídica se homodimerice a través de sus dominios CH2 y/o CH3. Como la tercera cadena polipeptídica contiene preferentemente la sustitución de "ojal", se heterodimerizará con la primera cadena polipeptídica, así como que se homodimerizará consigo misma. Se crea un botón preferido modificando un dominio Fc de IgG nativo para que contenga la modificación T366W. Se crea un ojal preferido modificando un dominio Fc de IgG nativo para que contenga la modificación T366S, L368A y Y407V. Para ayudar a purificar el homodímero de la tercera cadena polipeptídica del diacuerpo Fc monovalente biespecífico final que comprende las cadenas polipeptídicas primera, segunda y tercera, el sitio de unión de la proteína A de los dominios CH2 y CH3 de la tercera cadena polipeptídica preferentemente se muta por sustitución de aminoácidos en 55 la posición 435 (H435R). Por tanto, el homodímero de la tercera cadena polipeptídica no se unirá a la proteína A, si 60

bien el diacuerpo Fc monovalente biespecífico conservará su capacidad para unirse a la proteína A a través del sitio de unión de la proteína A en la primera cadena polipeptídica.

- 5 Una secuencia preferida para los dominios CH2 y CH3 de la primera cadena polipeptídica de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción tendrá la secuencia "**portadora del botón**" (**SEQ ID NO: 15**):

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

- 10 Una secuencia preferida para los dominios CH2 y CH3 de la tercera cadena polipeptídica de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción tendrá la secuencia "**portadora del ojal**" (**SEQ ID NO: 16**):

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

- 15 Como se observará, los dominios CH2-CH3 de la **SEQ ID NO: 15** y la **SEQ ID NO: 16** incluyen una sustitución en la posición 234 con alanina y en la 235 con alanina y por tanto, forman un dominio Fc que presenta una unión disminuida (o sustancialmente nula) a Fc<sub>Y</sub>RIA (CD64), Fc<sub>Y</sub>RIIA (CD32A), Fc<sub>Y</sub>RIIB (CD32B), Fc<sub>Y</sub>RIIIA (CD16a) o Fc<sub>Y</sub>RIIIB (CD16b) (en relación con la unión presentada por la región Fc de tipo silvestre (**SEQ ID NO: 14**)).

- 20 Se prefiere que la primera cadena polipeptídica tenga una secuencia CH2-CH3 "portadora del botón", tal como la de la **SEQ ID NO: 15**. Sin embargo, como se reconocerá, se podría emplear un dominio CH2-CH3 "portador del ojal" (por ejemplo, **SEQ ID NO: 16**) en la primera cadena polipeptídica, en cuyo caso, se emplearía un dominio CH2-CH3 "portador del botón" (por ejemplo, **SEQ ID NO: 15**) en la tercera cadena polipeptídica.

25 **5. Dominios variables CD19 preferidos**

- El dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena ligera de cualquier anticuerpo anti-CD19 puede usarse de acuerdo con la presente descripción. Preferentemente, sin embargo, tal dominio VL<sub>CD19</sub> tendrá la secuencia de 30 aminoácidos (**SEQ ID NO: 17**):

ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA  
SNRASGVPSR FSGSGSGTDH TLTIISSLEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG  
TKLEIK

en donde las secuencias subrayadas son, respectivamente, CDR1, CDR2 y CDR3, de la misma:

35 VL<sub>CD19</sub> CDR1: RASQSVSYMH (**SEQ ID NO: 18**)  
VL<sub>CD19</sub> CDR2: DASNRAS (**SEQ ID NO: 19**)  
VL<sub>CD19</sub> CDR3: FQGSVYPFT (**SEQ ID NO: 20**)

Asimismo, el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada de cualquier anticuerpo anti-CD19 puede usarse de acuerdo con la presente descripción. Preferentemente, sin embargo, tal dominio VH<sub>CD19</sub> tendrá la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 21**):

40 QVTLRESPA LVKPTQTLT TCTFSGFSLS TSGMVGWIR QPPGKALEWL  
AHIWWDDDKR YNPALKSRLT ISKDTSKNQV FLTMTNMDPV DTATYYCARM  
ELWSYYFDYW GQGTTVTVSS

en donde las secuencias subrayadas son, respectivamente, CDR1, CDR2 y CDR3, de la misma:

VH<sub>CD19</sub> CDR1: TSGMGVG (SEQ ID NO: 22)  
 VH<sub>CD19</sub> CDR2: HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 23)  
 VH<sub>CD19</sub> CDR3: MELWSYYFDY (SEQ ID NO: 24)

#### 6. Dominios variables CD3 preferidos

- 5 El dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena ligera de cualquier anticuerpo anti-CD3 puede usarse de acuerdo con la presente descripción. Preferentemente, sin embargo, tal dominio VL<sub>CD3</sub> tendrá la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 25):

QAVVTQEPLS TVSPGGTVTL TCRRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
GTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG

- 10 en donde las secuencias subrayadas son, respectivamente, CDR1, CDR2 y CDR3, de la misma:

VL<sub>CD3</sub> CDR1: RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 26)  
 VL<sub>CD3</sub> CDR2: GTNKRAP (SEQ ID NO: 27)  
 VL<sub>CD3</sub> CDR3: ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 28)

- 15 Asimismo, el dominio de unión a antígeno del dominio variable de cadena pesada de cualquier anticuerpo anti-CD3 puede usarse de acuerdo con la presente descripción. Preferentemente, sin embargo, tal dominio VH<sub>CD3</sub> tendrá la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 29):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR  
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR  
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

- 20 en donde las secuencias subrayadas son, respectivamente, CDR1, CDR2 y CDR3, de la misma:

VH<sub>CD3</sub> CDR1: TYAMN (SEQ ID NO: 30)  
 VH<sub>CD3</sub> CDR2: RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 31)  
 VH<sub>CD3</sub> CDR3: HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 32)

#### 7. Dominio de unión a albúmina opcional

- 25 Como se desvela en el documento WO 2012/018687, con el fin de mejorar aún más las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción, tales diacuerpos pueden modificarse para contener una porción polipeptídica de una proteína de unión al suero en uno o más de los extremos del diacuerpo. Lo más preferentemente, tal porción de polipéptido de una proteína de unión al suero se instalará en el extremo C del diacuerpo. Una porción de polipéptido particularmente preferida de una proteína de unión al suero para este fin es el dominio de unión a albúmina (ABD, por sus siglas en inglés) de la proteína G estreptocócica. Se prefiere particularmente el dominio 3 de unión a albúmina (ABD3) de la proteína G de la cepa G148 de *Streptococcus*.

- 35 El dominio de unión a albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa de *Streptococcus* G148 consta de 46 restos de aminoácidos que forman un paquete estable de tres hélices y tiene una amplia especificidad de unión a albúmina (Johansson, M.U. *et al.* (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules", *J. Biol. Chem.* 277(10):8114-8120). La albúmina es la proteína más abundante en el plasma y tiene una semivida de 19 días en los seres humanos. La albúmina posee varios sitios de unión a moléculas pequeñas que le permiten unirse de manera no covalente a otras proteínas y por tanto, prolongar su semivida en suero.

- 40 Por tanto, la segunda cadena polipeptídica de tal diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 o diacuerpo Fc monovalente biespecífico que tiene un dominio de unión a albúmina contiene un enlazador (**Enlazador 4**), que separa la espiral E (o espiral K) de dicha cadena polipeptídica del dominio de unión a albúmina. Una secuencia preferida para tal **Enlazador 4** es la **SEQ ID NO: 33**: GGGS. Un dominio de unión a albúmina preferido (**ABD**) tiene la secuencia (**SEQ ID NO: 34**): LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLIDAKSAEGVKALIDEILAALP.

#### C. Diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3 ilustrativo, "DART-A"

Se describe un diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3 ilustrativo capaz de unirse simultánea y específicamente a CD19 y a CD3. Este diacuerpo ilustrativo se denota como "**DART-A**". Se encontró que los diacuerpos de la presente descripción mostraban una actividad funcional mejorada en relación con otros diacuerpos de CD19 x CD3.

5 Como se ha indicado anteriormente, los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción comprenden tres cadenas polipeptídicas. La primera cadena polipeptídica del **DART-A** comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD19 ( $VL_{CD19}$ ) (**SEQ ID NO: 17**), un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 1**; **GGGS<sub>4</sub>GGG (SEQ ID NO: 1)**), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 ( $VH_{CD3}$ ) (**SEQ ID NO: 29**), un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 2**; **ASTKG (SEQ ID NO: 2)**), un dominio promotor de heterodímeros (espiral E) (**EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 12)**), un péptido enlazador intermedio (**Espaciador-Enlazador 3**; **GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 5)**), un polipéptido que contiene los dominios CH2 y CH3 "**portadores del botón**" (secuencia del dominio Fc, **SEQ ID NO: 15**) y un extremo C terminal.

10 15 Por tanto, la primera cadena polipeptídica del **DART-A** está compuesta por: **SEQ ID NO: 17 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 29 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 12 - SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 15**.

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

ENVLQSPATLSVTPGEKATITCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDASN  
RASGVPSRFSGSGSGTDHTLTISLEAEDAATYYCFQGSVYPFTFGQGKLE  
IKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG  
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTA  
VYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSSASTKGEVAACEKEVAALEKEV  
AALEKEVAALEKGGGDKTHCPCPAPEAAGGGSVFLFPPKPKDTLMISRTP  
EVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Un polinucleótido preferido que codifica dicho polipéptido es (**SEQ ID NO: 36**):

gagaatgtgctcacacagtcccctgcaactctgagcgtaactccaggggaga  
aggccaccatcacgttagagcctcccagagtgtgagctacatgcactggta  
tcagcagaaacctggacaagctcccaggttgcgtatctatgacgcgagcaac  
cgggctagtggcgttccatcccggtttctggctcaggatctggcactgacc  
acaccctcaccatatccagccttgaagccgaagatgccgcaacctaactactg  
cttcagggaggtgttatcccttacattcggtcagggtacaaagctggag  
attaagggtggaggatccggccggaggcggaggcggactctggatctg  
ggggaggcttggccagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcctc  
tggattcacccatcagcacatacgctatgaattgggtccgcaggctccagg  
aaggggctggagtggttggaggatcaggccaagtacaacaattatgcaa  
cctactatgccactctgtgaaggtagattcaccatctcaagagatgattc  
aaagaactactgttatctgcaaatgaacacgcctgaaaaccgaggacacggcc  
gtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaattttacgtgtttgg  
ttgcttattggggacagggacactggtaactgtgtctccgcctccaccaa  
ggcgaaatggccgcatgtgagaaagaggttgctgcttggagaaggagg  
gctgcacttgaaaaggaggatcgcagccctggagaaaggcggggggacaaaa  
ctcacacatgccaccgtgcccagcacctgaagccggggggaccgtcagt  
cttccttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctccggacc  
gaggtcacatgcgtggtgacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagt

tcaactggtacggtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcg  
 ggaggagcagtacaacacgacgtaccgtgtggcagcgtcctcaccgtcctg  
 caccaggactggctgaatggcaaggaggtacaagtgcaggtctccaacaaag  
 ccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg  
 agaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaac  
 caggtcagcctgtggcgcctggtaaaggctctatcccagcgcacatcgccg  
 tggagtggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcc  
 cgtgctggactccgacggctcctcttctacagcaagctcaccgtggac  
 aagagcaggtggcagcagggaaacgtcttcatgctccgtatgcgatgcatgagg  
 ctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccggtaaa

La segunda cadena polipeptídica del **DART-A** comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (**SEQ ID NO: 25**), un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 1**; **GGGSGGGG (SEQ ID NO: 21)**), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD19 (VH<sub>CD19</sub>) (**SEQ ID NO: 21**), un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 2**; **ASTKG (SEQ ID NO: 2)**), un dominio promotor de heterodímeros (espiral K) (**KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:13)**) y un extremo C terminal.

Por tanto, el segundo polipéptido del **DART-A** está compuesto por: **SEQ ID NO: 25 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 21 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 13**

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

QAVVTQEPESLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGG  
 TNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGT  
 KLTVLGGGGSGGGGQVTLRESPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVW  
 IROPPGKALEWLAHIWWDDDKNRNPALKSRLTISKDTSKNQVFLTMTNMDPV  
 DTATYYCARMELWSYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGKVAACKEKVAALKEKVA  
 15 ALKEKVAALKE

Un polinucleótido preferido que codifica dicho polipéptido tiene la secuencia (**SEQ ID NO: 38**):

caggctgtggtaactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcgaaactg  
 tgaccctgacatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgc  
 caattgggtgcagcagaagccaggacaggcaccaaggggcctgatcgggggt  
 acaaacaaaaggctccctggaccctgcacggtttctggaaagtctgctgg  
 gcgaaaggccctgtactattaccgggacaggccgaggacgaaagccga  
 ttactattgtgctctgtgttatagcaatctgtgggtgttcgggggtggcaca  
 aaactgactgtgctggaggggggtggatccggcggaggtggacaggtgacac  
 tgaggaaatctggtccagctctggtaaaaccactcagacgctcactctcac  
 ttgcacccatctggatgggttctcactgtccacatctggcatggagtaggctgg

20 attcgacagccacctggaaagccttggagtggtggcttgcacatctgggtgg  
 atgacgacaagcggataatccgcactgaagagcagactgaccatcagcaa  
 ggatacatccaagaaccagggtttctgaccatgaccaacatggaccctgtc  
 gatacagccacctactattgtgctcgcatggagttgtggctactacttcg  
 actattggggacaaggcacaaccgtgactgtctcatccgcctccaccaaggg  
 caaagtggccgcatgttaaggagaaagttgtctgtttgaaagagaaggcgcc  
 gcacttaaggaaaaggcgacgcctgaaagag

La tercera cadena polipeptídica del **DART-A** comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N terminal, un péptido (**Enlazador 3**; **DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 4)**), un polipéptido que contiene los dominios CH2 y CH3 "portadores del ojal" (secuencia del dominio Fc, **SEQ ID NO: 16**) y un extremo C terminal.

Por tanto, el tercer polipéptido del **DART-A** está compuesto por: **SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 16**

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

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSCHEDPE  
 VKFNWYVDGVEVHNNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS  
 NKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD  
 IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
 HEALHNRYTQKSLSLSPGK

5

Un polinucleótido preferido que codifica dicho polipéptido tiene la secuencia (**SEQ ID NO: 40**):

gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcggggggac  
 cgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccg  
 gaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagacccttag  
 gtcaagttcaactggtagtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaa  
 agccgcgggaggagcagtacaacacgacgtaccgtgtggtcagcgtcctcac  
 cgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaggtctcc  
 aacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggc  
 agccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccggaggagatgac  
 caagaaccaggtcagcctgagttgcgcagtcaaaggcttatcccagcgcac  
 atcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacca  
 cgcctccgtctggactccgacggctccttcctcgtcagcaagctcac  
 cgtggacaagagcaggtggcagcagggaaacgtcttcatgctccgtgatg  
 catgaggctctgcacaaccgctacacgcagaagagcctccctgtctccgg  
 gtaaa

10 **D. DART de control**

Para demostrar de forma más significativa las propiedades de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción, se construyeron dos DART de control. El primer DART de control (**"DART 1 de control"**) es capaz de unirse a la fluoresceína y al CD3. El segundo control DART (**"DART 2 de control"**) es capaz de unirse a la fluoresceína y al CD19.

20 El anticuerpo anti-fluoresceína utilizado para formar el **DART 1 de control** y el **DART 2 de control** fue el anticuerpo 4-4-20 (Gruber, M. et al. (1994) "Efficient Tumor Cell Lysis Mediated By A Bispecific Single Chain Antibody Expressed In Escherichia coli", J. Immunol. 152(11):5368-5374; Bedzyk, W.D. et al. (1989) "Comparison Of Variable Region Primary Structures Within An Anti-Fluorescein Idiotype Family", J. Biol. Chem. 264(3): 1565-1569) se utilizaron en diacuerpos de control. Las secuencias de aminoácidos de los dominios ligero variable y pesado variable del anticuerpo anti-fluoresceína 4-4-20 son las siguientes:

25 Secuencia de aminoácidos del dominio de cadena ligera variable del anticuerpo anti-fluoresceína 4-4-20 (**SEQ ID NO: 41**):

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

30 Secuencia de aminoácidos del dominio de cadena pesada variable del anticuerpo anti-fluoresceína 4-4-20 (**SEQ ID NO: 42**):

EVKLD**E**GGG LVQPGRPMKL SCVASGFTFS DYWMNWVRQS PEKGLEWVAQ  
IRNKPNYET YYSDSVKGRF TISRDDSKSS VYLOMNNLRV EDMGIYYCTG  
SYYGMDYWGQ GTSVTVSS

35 **1. DART 1 de control (Fluoresceína x CD3)**

La primera cadena polipeptídica del **DART 1 de control** comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a la fluoresceína (VL<sub>4-4-20</sub>) (**SEQ ID NO: 41**), un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 1**)), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (**SEQ ID NO: 29**), un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO: 3**)), un dominio promotor de heterodímeros (espiral E) (**EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK** (**SEQ ID NO: 10**)), un péptido enlazador intermedio (**Espaciador-Enlazador 3**; GGGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO: 5**)), un polipéptido que contiene los dominios CH2 y CH3 "portadores del botón" (secuencia del dominio Fc, **SEQ ID NO: 15**) y un extremo C terminal.

5 10 Por tanto, la primera cadena polipeptídica del **DART 1 de control** está compuesta por: **SEQ ID NO: 41 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 29 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 10 - SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 15**.

La secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica del **DART 1 de control** es (**SEQ ID NO: 43**):

DVVMTQTPFSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLITYK  
VSNRFSGVVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLE  
IKGGGGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGL  
EWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR  
HGNFGNSYVSWFAYWGQTLTVSSASTKGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAA  
LEKGGGDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS  
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN  
15 HYTQKSLSLSPGK

20 25 La segunda cadena polipeptídica del **DART 1 de control** comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (**SEQ ID NO: 25**), un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 1**)), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a la fluoresceína (VH<sub>Fluor</sub>) (**SEQ ID NO: 42**), un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO: 3**)), un dominio promotor de heterodímeros (espiral K) (**KVAALK-E-KVAALK-E-KVAALK-E-KVAALK-E** (**SEQ ID NO: 11**)) y un extremo C terminal.

Por tanto, la segunda cadena polipeptídica del **DART 1 de control** está compuesta por: **SEQ ID NO: 25 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 42 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 11**.

La secuencia de aminoácidos de la segunda cadena polipeptídica del **DART 1 de control** es (**SEQ ID NO: 44**):

QAVVTQEPLSTVSPGGTVTLCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK  
RAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG  
GGGSGGGGEVKLDEGGGLVQPGPKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEW  
VAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLOMNNLRVEDMGIYYCTGSY  
YGMDYWGQGTTSVSSASTKGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALK  
30

La tercera cadena polipeptídica del **DART 1 de control** comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N terminal, un péptido (**Enlazador 3**; DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO: 4**)), un polipéptido que contiene los dominios CH2 y CH3 "portadores del ojal" (secuencia del dominio Fc, **SEQ ID NO: 16**) y un extremo C terminal.

35 Por tanto, la tercera cadena polipeptídica del **DART 1 de control** está compuesta por: **SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 16**.

La secuencia de aminoácidos de la tercera cadena polipeptídica del **DART 1 de control** es (**SEQ ID NO: 39**):

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEP  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS  
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
40 HEALHNRYTQKSLSLSPGK

## 2. DART 2 de control (Fluoresceína x CD19)

La primera cadena polipeptídica del **DART de control 2** comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD19 ( $VL_{CD19}$ ) (**SEQ ID NO: 17**),

- 5 un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 1**; **GGGSGGGG (SEQ ID NO: 1)**), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a la fluoresceína ( $VH_{Flúor}$ ) (**SEQ ID NO: 42**), un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 2**; **GGCGGG (SEQ ID NO: 3)**), un dominio promotor de heterodímeros (espiral E) (**EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 10)**), un péptido enlazador intermedio (**Espaciador-Enlazador 3**; **GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 5)**), un polipéptido que contiene los dominios CH2 y CH3 "portadores del botón" (secuencia del dominio Fc, **SEQ ID NO: 15**) y un extremo C terminal.

Por tanto, la primera cadena polipeptídica del **DART 2 de control** está compuesta por: **SEQ ID NO: 17 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 42 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 10 - SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 15**.

- 15 La secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica del **DART 2 de control** es (**SEQ ID NO: 45**):

ENVLTQSPATLSVTPGEKATITCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAS  
GVPSRFSGSGSGTDHTLTISLEAEDAATYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIKGGGS  
GGGGEVKLDETGGGLVQPGPRPMKLSCLCVASGFTFSDYWMNWRQSPKGLEWVAQI  
RNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMD  
YWGQGTSVTVSSASTKGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGDKTHTCP  
PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIKTIS  
KAKGQPREGQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 20 La segunda cadena polipeptídica del **DART 2 de control** comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a la fluoresceína ( $VL_{Flúor}$ ) (**SEQ ID NO: 41**), un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 1**; **GGGSGGGG (SEQ ID NO: 1)**), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD3 ( $VH_{CD3}$ ) (**SEQ ID NO: 29**), un péptido enlazador intermedio (**Enlazador 2**; **GGCGGG (SEQ ID NO: 3)**), un dominio promotor de heterodímeros (espiral K) (**KVAALK-E-KVAALK-E-KVAALK-E-KVAALK-E (SEQ ID NO: 11)**) y un extremo C terminal.

25 Por tanto, la segunda cadena polipeptídica del **DART 2 de control** está compuesta por: **SEQ ID NO: 41 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 29 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 11**.

- 30 La secuencia de aminoácidos de la segunda cadena polipeptídica del **DART 2 de control** es (**SEQ ID NO: 46**):

QAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK  
RAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG  
GGGSGGGGEVKLDETGGGLVQPGPRPMKLSCLCVASGFTFSDYWMNWRQSPKGLEW  
VAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSY  
YGMDYWGQGTSVTVSSASTKGKVAACKEKAALKEKAALKEKAALKE

- 35 La tercera cadena polipeptídica del **DART 2 de control** comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N terminal, un péptido (**Enlazador 3**; **DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 4)**), un polipéptido que contiene los dominios CH2 y CH3 "portadores del ojal" (secuencia del dominio Fc, **SEQ ID NO: 16**) y un extremo C terminal.

Por tanto, la tercera cadena polipeptídica del **DART 2 de control** está compuesta por: **SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 16**.

- 40 La secuencia de aminoácidos del tercer polipéptido del **DART 2 de control** es (**SEQ ID NO: 39**):

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS  
NKALPAPIKTISKAKGQPREGQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
HEALHNRYTQKSLSLSPGK

## E. Composiciones farmacéuticas

- 5 Las composiciones de la descripción incluyen composiciones de fármaco a granel útiles para la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que sean apropiadas para la administración a un sujeto o paciente) que puedan usarse en la preparación de formas farmacéuticas unitarias. Tales composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción o una combinación de tales agentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, las composiciones 10 de la descripción comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz del diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 de la descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 de la descripción (y en particular, un diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3) y un segundo anticuerpo terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico de tumor) que es específico para un antígeno de cáncer concreto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 En una descripción específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que ha sido aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o que figura en la farmacopea de los Estados Unidos o en otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y más particularmente, en seres humanos. El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o portador con el que se administra el agente terapéutico. Dichos transportadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetales o 25 sintéticos, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Como transportadores líquidos pueden emplearse también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también 30 puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.
- 35 Generalmente, los ingredientes de las composiciones de la descripción se suministran bien por separado o se mezclan conjuntamente en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o sobrecito que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contenga agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los principios pueden 40 mezclarse antes de la administración.
- 45 Las composiciones de la descripción pueden formularse en sus formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, las formadas con aniones tales como los derivados del ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y las formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etylamo-etalol, histidina, procaína, etc.
- 50 También se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de un diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 de la presente descripción (y en particular, un diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3) solo o con tal vehículo farmacéuticamente aceptable. De manera adicional, también se 55 puede incluir uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad en el paquete o kit farmacéutico. También se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la descripción. Opcionalmente, asociado a tal(es) recipiente(s), puede haber un aviso en la forma prescrita por un organismo estatal que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicho aviso la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración a seres humanos.
- 60 También se describen kits que pueden usarse en los métodos anteriores. Un kit puede comprender diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 y más preferentemente, un diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3, de la descripción. El kit puede comprender además uno o más agentes profilácticos o terapéuticos diferentes útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más recipientes; y/o el kit puede comprender además uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más antígenos de cáncer asociados con el cáncer. En ciertas descripciones, el otro agente profiláctico o terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico. En otras descripciones, el agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico biológico u hormonal.

**F. Métodos de administración**

Las composiciones de la presente descripción pueden proporcionarse para el tratamiento, profilaxis y 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 proteína de fusión o una molécula conjugada de la descripción o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o una molécula conjugada de la descripción. En un aspecto preferido, dichas

5 composiciones están sustancialmente purificadas (es decir, esencialmente libres de sustancias que limiten su efecto o produzcan efectos secundarios no deseados). En una descripción específica, el sujeto es un animal, preferentemente un mamífero tal como un animal no primate (por ejemplo, bovino, equino, felino, canino, roedor, etc.) o un primate (por ejemplo, mono, tal como, un mono cinomolgo, ser humano, etc.). En una descripción preferida, el sujeto es un ser humano.

10 Se conocen diversos sistemas de liberación y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica de la descripción, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o la proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu *et al.* (1987) "Receptor-Mediated *In Vitro* Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System", *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432), la construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retrovírico u otro, etc.

15 Los métodos para administrar una molécula de la descripción incluyen, pero sin limitación, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral). En una descripción específica, los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la descripción se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en embolada, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, se puede emplear también la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y formulación con un agente de formación de aerosol. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 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 las publicaciones del PCT n.º WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903.

20 30 También se describe que los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 (y en particular, el diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3) de la descripción se envasan en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de la molécula. En una descripción, los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la descripción se suministran como un polvo seco esterilizado liofilizado o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado y se pueden reconstituir, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración apropiada para la administración a un sujeto. Preferentemente, los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la descripción se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente cerrado en una dosificación unitaria de al menos 5 µg, más preferentemente 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.

25 35 40 45 50 Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 liofilizados o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción deben almacenarse entre 2 y 8 °C en su envase original y las moléculas deben administrarse en el transcurso de 12 horas, preferentemente en el transcurso de 6 horas, en el transcurso de 5 horas, en el transcurso de 3 horas o en el transcurso de 1 hora tras su reconstitución. En una descripción alternativa, los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la descripción se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente cerrado indicando la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferentemente, la forma líquida de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la descripción se suministra en un recipiente herméticamente cerrado en el que las moléculas están presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml, más preferentemente 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.

55 60 La cantidad de la composición de la descripción que será eficaz en el tratamiento, la prevención o la mejoría de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. La dosis exacta que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la afección y debe decidirse de acuerdo con el criterio del facultativo y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba de modelos *in vitro* o animales.

65 Para diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 o diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3, abarcados por la descripción, la dosis administrada a un paciente se determina preferentemente basándose en el peso corporal (kg) del sujeto receptor. La dosis administrada normalmente es de al menos aproximadamente 0,3 ng/kg por día a aproximadamente 0,9 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 1 ng/kg por día a aproximadamente 3 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 3 ng/kg por día a aproximadamente 9 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 10 ng/kg por día a aproximadamente 30 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 30 ng/kg por día a aproximadamente 90 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 100 ng/kg por día a aproximadamente 300 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 200 ng/kg por día a aproximadamente 600 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 300 ng/kg por día a aproximadamente 900 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 400 ng/kg

por día a aproximadamente 800 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 500 ng/kg por día a aproximadamente 1000 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 600 ng/kg por día a aproximadamente 1000 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 700 ng/kg por día a aproximadamente 1000 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 800 ng/kg por día a aproximadamente 1000 ng/kg por día, de al menos aproximadamente 900 ng/kg por día a aproximadamente 1000 ng/kg por día o al menos aproximadamente 1000 ng/kg por día.

5 En otra descripción, al paciente se le administra un régimen de tratamiento que comprende una o más dosis de dicha cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 (y en particular, los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3) abarcados por la descripción, en donde el

10 régimen de tratamiento se administra durante 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días u 7 días. En ciertas descripciones, el régimen de tratamiento comprende la administración intermitente de dosis de la cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 abarcados por la descripción (por ejemplo, administrando una dosis el Día 1, el Día 2, el Día 3 y el Día 4 de una semana determinada y no administrando dosis de la cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 (y en particular, un diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3) abarcados por la descripción el Día 5, el Día 6 y Día 7 de la misma semana). Normalmente, hay 1, 2, 3, 4, 5 o más ciclos de tratamiento. Cada ciclo puede ser el mismo régimen o un régimen diferente.

15 En otra descripción, la dosis administrada se aumenta durante el primer trimestre, la primera mitad o los primeros dos tercios o tres cuartos del régimen o regímenes (por ejemplo, durante el primer, segundo o tercer régimen de un tratamiento de 4 ciclos) hasta que se alcance la cantidad diaria profiláctica o terapéuticamente eficaz de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 (y en particular, los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3) abarcados por la descripción.

20 La **Tabla 2** proporciona 5 ejemplos de diferentes regímenes de dosificación descritos anteriormente para un ciclo de tratamiento típico.

Tabla 2						
Régimen	Día	Dosis de diacuerpo (ng de diacuerpo por kg de peso del sujeto por día)				
1	1, 2, 3, 4	100	100	100	100	100
	5, 6, 7	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
2	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1.000
	5, 6, 7	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
3	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1.000
	5, 6, 7	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
4	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1.000
	5, 6, 7	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna

30 La dosificación y la frecuencia de administración de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción pueden reducirse o alterarse mejorando la captación y la penetración tisular de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

35 La dosificación de los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la descripción administrada a un paciente puede calcularse para su uso como terapia de agente único. Como alternativa, los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 o los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la descripción se usan junto con otras composiciones terapéuticas y la dosis administrada a un paciente es más baja que cuando dichas moléculas se usan como terapia de agente único.

40 Las composiciones farmacéuticas de la descripción se pueden administrar localmente en el área que necesita tratamiento; esto se puede lograr mediante, por ejemplo y no a modo de limitación, infusión local, mediante inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas elásticas o fibras. Preferentemente, cuando se administra una molécula de la descripción, debe prestarse atención en usar materiales a los que no se absorba la molécula.

45 Las composiciones de la descripción se pueden liberar en una vesícula, en particular, un liposoma (véase, Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533); Treat *et al.*, en LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, págs. 317-327).

50 Las composiciones de la descripción se pueden suministrar en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la

descripción. Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.526.938; la publicación del PCT WO 91/05548; la publicación del PCT WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.* (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam *et al.* (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760. En una descripción, se puede usar una bomba en un sistema de liberación controlada (véanse Langer, citado anteriormente; Sefton, (1987) "Implantable Pumps", CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald *et al.* (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis", Surgery 88:507-516; y Saudek *et al.* (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery", N. Engl. J. Med. 321:574-579). En otra descripción, se pueden usar materiales poliméricos para obtener la liberación controlada de las moléculas (véanse, por ejemplo, MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva 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; patente de EE. UU. n.º 5.679.377; patente de EE. UU. n.º 5.916.597; patente de EE. UU. n.º 5.912.015; patente de EE. UU. n.º 5.989.463; patente de EE. UU. n.º 5.128.326; publicación del PCT n.º WO 99/15154; y publicación del PCT n.º WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros que se utilizan en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitación, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólicos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA) y poliortoésteres. Se puede colocar un sistema de liberación controlada próximo a la diana terapéutica (por ejemplo, los pulmones), siendo necesaria, por tanto, solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada pueden usarse de acuerdo con Dunn *et al.* (véase el documento U.S. 5.945.155). Este método en concreto se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada *in situ* del material bioactivo a partir del sistema polimérico. La implantación puede producirse, en general, en cualquier parte del organismo del paciente que necesite el tratamiento terapéutico. Se puede utilizar un sistema de suministro sostenido no polimérico, con lo que, como sistema de liberación del fármaco, se usa un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto. Tras la implantación en el cuerpo, el disolvente orgánico del implante se disipará, dispersará o lixiviará de la composición hacia el fluido del tejido circundante y el material no polimérico coagulará o precipitará poco a poco, formando una matriz sólida, matriz microporosa (véase el documento US 5.888.533).

Los sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533). Se puede usar cualquier técnica conocida por un experto para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la descripción. Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.526.938; las publicaciones internacionales del PCT n.º WO 91/05548 y el documento WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.* (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam *et al.* (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

Cuando la composición de la descripción es un ácido nucleico que codifica un diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 de la descripción, el ácido nucleico se puede administrar *en vivo* para promover la expresión de su diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 codificado o su diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3, mediante su construcción como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y su administración de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retrovírico (véase la patente de EE. UU. n.º 4.980.286) o por inyección directa o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont) o recubriendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección o administrándolo en unión a un péptido de tipo homeocaja que se sabe 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. Como alternativa, se puede introducir un ácido nucleico intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula hospedadora para su expresión por recombinación homóloga.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 (y en particular, un diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3) de la descripción puede incluir un tratamiento único o preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto se trata con dicho diacuerpo una vez por semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, preferentemente entre 2 y 8 semanas, más preferentemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas e incluso más preferentemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. Las composiciones farmacéuticas de la

5 descripción pueden administrarse una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosis eficaz de las moléculas usadas para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el ciclo del tratamiento específico.

#### G. Usos de las composiciones de la descripción

10 Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción (y en particular, los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de CD19 x CD3 de la presente descripción) tienen la capacidad de tratar cualquier enfermedad o afección asociada o caracterizada por la expresión de CD19. Por tanto, sin limitación, tales moléculas pueden emplearse en el diagnóstico o tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), incluida la crisis blástica de LMC y el oncogén Abelson asociado con LMC (translocación Bcr-ABL), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia linfoblástica aguda de precursores de linfocitos B (B-ALL, por sus siglas en inglés), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica (LLC), incluyendo el síndrome de Richter o la transformación de Richter de LLC, tricoleucemia (HCL), neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas (BPDCN), linfoma no Hodgkin (LNH), incluyendo la leucemia de células del manto (MCL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica o linfoma de Burkitt; lupus autoinmune (SLE), alergia, asma y artritis reumatoide. Los diacuerpos monovalentes biespecíficos de la presente descripción pueden usarse adicionalmente en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente.

#### Ejemplos

25 Habiéndose descrito en líneas generales la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no tienen por objeto ser limitantes de la presente descripción a menos que se especifique.

#### Ejemplo 1

##### 30 Cuantificación de la expresión de CD19 de la superficie celular

Para identificar líneas celulares diana adecuadas para evaluar la actividad biológica de los diacuerpos biespecíficos de CD19 x CD3, se confirmaron primero los niveles de expresión de CD19 de superficie celular utilizando FACS cuantitativo (QFACS) en un panel de líneas celulares de linfoma/leucemia de linfocitos B humanos, incluyendo Nalm-6 (leucemia linfoblástica aguda), Raji (linfoma de Burkitt), Daudi (linfoma de Burkitt), HBL-2 (linfoma de células del manto), MEC-1 (leucemia linfocítica crónica) y Jeko-1 (linfoma de células del manto), MOLM-13 (línea celular de leucemia mieloide aguda), JIMT1 (cáncer de mama) y Colo205 (cáncer de colon). Las cifras absolutas de sitios de unión de anticuerpos a CD19 en la superficie se calcularon utilizando un kit QFACS. Como se muestra en la **Tabla 3**, las cifras absolutas de los sitios de unión a CD19 en las líneas celulares estaban en el orden de Raji (alto) > Nalm-6 (medio) > Daudi (medio) > HBL2 (medio) > MEC-1 (bajo) > Jeko-1 (bajo). Como se esperaba, MOLM-3, JIMT-1 y Colo205 carecían de expresión de CD19, lo cual es coherente con que CD19 sea un antígeno específico de linfocitos B.

45 Tabla 3	
Línea celular diana	Expresión de CD19 de superficie (sitios de unión de anticuerpos)
Raji	670.322
Nalm-6	442.730
Daudi	369.860
HBL-2	334.725
MEC-1	177.025
Jeko-1	124.396

#### 45 Ejemplo 2

#### Afinidades de unión

50 Con el fin de cuantificar el grado de unión entre un diacuerpo monovalente biespecífico de CD19 x CD3 y un CD3 humano o de mono cinomolgo, se realizaron análisis de BIACORE™ utilizando el diacuerpo Fc monovalente biespecífico de CD19 x CD3 ilustrativo, **DART-A**. Los análisis de BIACORE™ miden la tasa de disociación,  $k_d$ . La afinidad de unión ( $KD$ ) entre un anticuerpo y su diana es una función de las constantes cinéticas de asociación ("on-rate",  $k_a$ ) y disociación ("off-rate",  $k_d$ ) según la fórmula:  $KD = [k_d]/[k_a]$ . El análisis de BIACORE™ utiliza resonancia de plasmiones superficiales para medir directamente estos parámetros cinéticos.

Los resultados de la unión del **DART-A** (0-100 nM) a CD3 y CD19 humanos y de mono cinomolgo solubles, analizados por tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) (BIAcore), se muestran en la **Tabla 4**.

- 5 La afinidad de unión del **DART-A** es similar para CD3 humano y de mono cinomolgo (KD = 21,2 nM y 21,9 nM, respectivamente). Sin embargo, **DART-A** tiene una afinidad aproximadamente 10 veces menor por el CD19 del mono cinomolgo que por el CD19 humano (KD = 20,3 nM y 2,0 nM, respectivamente) debido a una mayor constante de velocidad de disociación ( $k_d$ ) del CD19 del mono cinomolgo. El mono cinomolgo sigue siendo una especie relevante para las evaluaciones toxicológicas, aunque se debe considerar la diferencia en la afinidad de unión a CD19.

10

Tabla 4			
Antígenos	$k_a$ ( $\pm$ DT) (M-1s-1)	$k_d$ ( $\pm$ DT) (s-1)	KD ( $\pm$ DT) (nM)
Cd3 $\varepsilon$ / $\delta$ humano	$2,2 \times 10^5$	$4,5 (\pm 0,1) \times 10^{-3}$	21,2 ( $\pm 1,7$ )
Cd3 $\varepsilon$ / $\delta$ de cinomolgo	$2,0 (\pm 0,1) \times 10^5$	$4,3 (\pm 0,2) \times 10^{-3}$	21,9 ( $\pm 1,2$ )
CD19-His humano	$2,8 (\pm 0,3) \times 10^5$	$5,6 (\pm 0,6) \times 10^{-4}$	2,0 ( $\pm 0,2$ )
CD19-His de cinomolgo	$2,4 (\pm 0,1) \times 10^5$	$4,7 (\pm 1,1) \times 10^{-3}$	20,3 ( $\pm 1,3$ )

### Ejemplo 3

#### Características de la unión celular

- 15 La unión del **DART-A** a leucocitos de ratón, rata, conejo, mono cinomolgo y de sangre humana (purificados a partir de sangre completa) se evaluó *in vitro* mediante citometría de flujo. Los leucocitos se tiñeron con **DART-A**, así como **DART 1 de control** y **DART 2 de control**, a concentraciones de 25 o 100 nM durante aproximadamente 1 hora. **DART 2 de control** contiene el mismo componente de unión a CD19 que **DART-A**, si bien **DART 1 de control** contiene el mismo componente de unión a CD3 que **DART-A**. Después de la incubación, las proteínas DART unidas a los leucocitos se detectaron con un mAb anti-espiral E/espiral K (EK), que reconoce la región de heterodimerización de espiral EK de las proteínas DART. No se observó unión a **DART-A** en los leucocitos sanguíneos de ratón, de rata o de conejo. Asimismo, ninguno de los diacuerpos de DART de control mostró ninguna unión a leucocitos de ratón, de rata o de conejo. Como se esperaba, ambas concentraciones de **DART-A** probadas mostraron una unión específica a los leucocitos de sangre humana y de mono cinomolgo.

20 25 30 35 40 45

Se utilizó un ensayo ELISA bifuncional para demostrar la captación simultánea de ambos antígenos diana por **DART-A**. Las placas de ELISA se revistieron con heterodímero de CD3 $\varepsilon$ / $\delta$  humano soluble y se incubaron a 4 °C durante la noche y a continuación, se bloquearon con BSA. Se añadieron varias concentraciones de **DART-A**, seguido de la adición de CD19-biotina humana soluble. Se lavaron las placas y se detectó el complejo inmune con sustrato quimioluminiscente conjugado con estreptavidina. Como se muestra en la **Figura 3**, **DART-A** es capaz de unirse simultáneamente a CD19 y CD3.

- 35 La unión biespecífica del **DART-A** se evaluó además en leucocitos tanto de sangre humana como de mono cinomolgo (purificados a partir de sangre completa) mediante citometría de flujo. Los leucocitos se tiñeron con **DART-A**, **DART 1 de control** o **DART 2 de control** a concentraciones que oscilan entre 0,005 y 80 nM durante aproximadamente 1 hora. Después de la incubación, la unión a los leucocitos se detectó usando un mAb biotinilado anti-espiral E/espiral K (EK), que reconoce la región de heterodimerización de espiral EK de las proteínas DART y la estreptavidina-PE. Ya que **DART-A** se une a CD3, se usó una combinación de CD4 y CD8 para definir la población de linfocitos T. De forma similar, se usó CD20 como un marcador de linfocitos B en lugar de CD19. Por tanto, en este estudio, los eventos seleccionados por CD4+ y CD8+ representan la población de linfocitos T y los eventos seleccionados por CD20+ representan la población de linfocitos B. **DART-A** demostró unión biespecífica a linfocitos B y T tanto humanos como de mono cinomolgo. Por el contrario, los diacuerpos DART de control mostraron solo unión monoespecífica a los linfocitos B (**DART 2 de control**) o a linfocitos T (**DART 1 de control**) de acuerdo con su especificidad de unión correspondiente. Las curvas de titulación de unión de diacuerpos **DART-A** y DART de control para linfocitos B y T humanos y de mono cinomolgo se proporcionan en las **Figuras 4A-4B** y **Figuras 5A-5B**.

### Ejemplo 4

#### Destrucción redirigida mediada por DART-A de células tumorales diana utilizando linfocitos T humanos

- 50 55
- La capacidad del **DART-A** para mediar la destrucción de células diana redirigida se evaluó en 3 líneas celulares de linfoma B diana, Raji/GF (linfoma de Burkitt), HBL-2 (linfoma de células de pantalla) y Jeko-1 (linfoma de células de pantalla), mostrando un intervalo de expresión de CD19, usando linfocitos T primarios humanos purificados como células efectoras. Las células Raji/GF mostraron los niveles más altos de expresión de CD19, seguido de niveles medios de expresión de CD19 en células HBL-2 y niveles más bajos de expresión de CD19 en células Jeko-1. La destrucción de células tumorales diana se midió utilizando un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), en el que la actividad enzimática de la LDH liberada de las células se mide cuantitativamente tras la muerte celular o

mediante un ensayo de luciferasa en el que la unidad de luz relativa (RLU) de luciferasa es la lectura para indicar la viabilidad relativa de las células diana Raji/GF, que están modificadas por ingeniería genética para expresar tanto la proteína verde fluorescente (GFP) como los genes indicadores de luciferasa.

- 5 **DART-A** mostró una destrucción celular redirigida potente en las 3 líneas celulares cuando se usaron linfocitos T purificados de múltiples donantes humanos independientes en una relación de células efectoras a diana (E:T) de 10:1 (**Figuras 6A-6C**). Los valores de concentración efectiva promedio al 50 % de la actividad máxima (CE50) fueron de  $1,05 \times 10^{-1}$  pM para las células HBL-2;  $3,07 \times 10^{-1}$  pM para las células Raji/GF; y  $1,46 \times 10^{-1}$  pM para las células Jeko-1 (**Tabla 5**). **DART 1 de control** no medió en la destrucción redirigida de linfocitos T de las células diana. Lo que es más importante, no se observó actividad de destrucción celular en las líneas celulares (Molm-13 y Colo205) que no expresan CD19 (**Figuras 6D-6F**).

Tabla 5 Sumario de los valores de CE50 de la destrucción redirigida mediada por DART-A representativa de las células Raji/GF diana en relaciones variables de células E:T						
	E:T = 10:1		E:T = 5:1		E:T = 2,5:1	
Citotoxicidad	CE50 (pM)	Emáx (%)	CE50 (pM)	Emáx (%)	CE50 (pM)	Emáx (%)
24 horas	0,14	63	0,67	24	N/D	4
48 horas	0,0441	73	0,38	48	1,08	11

- 15 Para evaluar la actividad del **DART-A** en presencia de un menor número de células efectoras, se probó la destrucción celular redirigida con relaciones de células E:T más bajas de 5:1, 2,5:1 y 1:1 en células Raji/GF después de la incubación con **DART-A** durante 24 a 96 horas. La actividad citotóxica observada en la relación 5:1 fue aproximadamente la mitad de la actividad máxima observada en la relación 10:1; también se observó una actividad específica más baja con una relación de células E:T de 2,5:1 en los puntos temporales tanto de 24 como de 48 horas (**Figuras 7A-7D** y **Tabla 5**). Después de la incubación durante 72 o 96 horas, la citotoxicidad de las células Raji/GF aumentó significativamente en las relaciones 2,5:1 y 1:1 (véanse las **Figuras 8A-8D** y la **Tabla 6**). Es de destacar que la lisis celular eficaz en relaciones de células E:T más bajas aumentó en las células Raji/GF con el tiempo, lo que sugiere la destrucción de células diana en serie por los linfocitos T activados con **DART-A**. La cinética sugiere que el tiempo es el factor limitante para que un número bajo de linfocitos T elimine eficazmente un mayor número de células diana. En conclusión, los datos de múltiples experimentos que utilizan linfocitos T humanos de diferentes donantes indican que la actividad de destrucción celular redirigida de **DART-A** depende tanto de la relación de células E:T como del tiempo, particularmente a relaciones de células E:T más bajas.

Tabla 6 Sumario de los valores CE50 de la destrucción redirigida mediada por DART-A representativa de células Raji/GF diana a relaciones de células E:T más bajas				
	E:T = 2,5:1		E:T = 1:1	
Citotoxicidad	CE50 (pM)	Emáx (%)	CE50 (pM)	Emáx (%)
72 horas	1,54	64	2,79	33
96 horas	0,422	87	0,440	56

#### Ejemplo 5

##### 30 Agotamiento de linfocitos B autólogos mediado por DART-A en PBMC humanas y de mono cinomolgo

- Como los linfocitos B normales expresan CD19 y como **DART-A** mostró una reacción cruzada con CD19 y CD3 de mono cinomolgo (**Ejemplo 2, Figuras 4A-4B** y **Figuras 5A-5B**), se investigó la citotoxicidad mediada por **DART-A** en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) tanto humanas como de mono cinomolgo. Se observó un agotamiento de los linfocitos B CD20+ dependiente de la dosis en PBMC tanto humanas como de mono cinomolgo después del tratamiento con **DART-A** (**Figuras 9A-9B**). Como se esperaba, no se observó agotamiento de linfocitos B después del tratamiento con **DART 1 de control**.
- 40 Para confirmar además la actividad de **DART-A** en las PBMC, se usaron múltiples donantes de PBMC humanos o de mono cinomolgo independientes con relaciones variables de E:T de linfocitos T (efectores) a linfocitos B (diana) para evaluar la potencia. Como sumario (**Tabla 7**), los valores de CE50 para el agotamiento de linfocitos B humanos variaron entre 1,84 y 6,27 pM; si bien los valores de CE50 para el agotamiento de los linfocitos B de mono cinomolgo estuvieron entre 106,8 y 859,1 pM. La potencia de **DART-A** para el agotamiento de linfocitos B humanos autólogos se mostró mayor que para el agotamiento de linfocitos B de mono cinomolgo (aproximadamente 100 veces mayor en promedio; intervalo: 19 a 312 veces). Sin embargo, cabe señalar que la relación de células E:T en las PBMC de mono cinomolgo (alrededor de 4:1 en promedio) fue menor que la de las PBMC humanas (alrededor de 8:1 en promedio), lo que probablemente contribuyó a la mayor diferencia en los valores de CE50, dado que la actividad de destrucción
- 45

redirigida de **DART-A** es dependiente de la relación de células E:T. Las diferencias potenciales en los niveles de expresión de CD19 entre los linfocitos B humanos y de mono cinomolgo pueden ser otro factor variable que contribuya a la diferencia aparente en la potencia.

**Tabla 7**  
**Sumario de los valores CE50 para el agotamiento de linfocitos B autólogos después del tratamiento de PBMC humanas o de mono cinomolgo con DART-A**

	Valores de CE50 (pM)			Valores de CE50 (pM)	
	<b>DART-A</b>	DART de control		<b>DART-A</b>	DART de control
Humanas 5 (E:T= 8:1)	6,27	Sin actividad	Cinomolgo 5 (E:T= 3:1)	166,2	Sin actividad
Humanas 6 (E:T= 8:1)	2,75	Sin actividad	Cinomolgo 6 (E:T= 2:1)	859,1	Sin actividad
Humanas 7 (E:T= 5:1)	5,52	Sin actividad	Cinomolgo 7 (E:T= 3:1)	106,8	Sin actividad
Humanas 8 (E:T= 9:1)	1,84	Sin actividad	Cinomolgo 8 (E:T= 7:1)	239,1	Sin actividad
Media	4,20	No procede	Media	342,8	No procede

5 Es importante observar que la citotoxicidad eficaz mediada por **DART-A** contra las células diana Raji/GF cuando se usaron PBMC de mono cinomolgo como células efectoras con un CE50 de  $1,30 \times 10^{-2}$  pM (**Figura 10**) es similar a la observada cuando se usaron linfocitos T humanos como células efectoras (CE50 promedio =  $3,07 \times 10^{-1}$  pM), lo que indica que los linfocitos T humanos y de mono cinomolgo tienen una actividad comparable contra la misma línea celular diana. Estos datos respaldan aún más el uso del mono cinomolgo como una especie relevante para la evaluación de **DART-A** en estudios de toxicología no clínica.

10 **Ejemplo 6**  
**15 Evaluación de la liberación de citocinas mediada por DART-A utilizando células efectoras humanas o de mono cinomolgo**

20 El agotamiento mediado por **DART-A** de la población de linfocitos B en PBMC humanas y de mono cinomolgo se asoció con la liberación de citocinas en PBMC tanto humanas como de mono cinomolgo. Como se resume a continuación en la **Tabla 8**, los valores de CE50 para la liberación de citocinas son equivalentes o superiores a los del agotamiento de linfocitos B autólogos humanos o de mono cinomolgo, indicando que **DART-A** es más potente para mediar en el agotamiento de los linfocitos B que para inducir la liberación de citocinas *in vitro*. Los perfiles de liberación de citocinas entre humanos y monos cinomolgos *in vitro* tienen algunas similitudes y algunas diferencias. IFN-γ y TNF-α fueron las citocinas predominantes liberadas en ambas especies después del tratamiento con **DART-A**. Sin embargo, 25 IL-6 fue la tercera citocina más predominante producida en PBMC humanas según los valores de Emáx, si bien IL-2 se produjo en cantidades sustanciales solo en PBMC de mono cinomolgo. La comparación de los valores medios de CE50 para las citocinas más sensibles producidas en PBMC después de la incubación con **DART-A** (IFN-γ, TNF-α e IL-6 en las PBMC humanas) con los valores medios de CE50 para el agotamiento de linfocitos B autólogos, reveló que 30 hay al menos un margen de seguridad aparente de 6 veces, como se reflejó en la diferencia entre el agotamiento de los linfocitos B y la producción de citocinas en PBMC humanas (**Tabla 9**).

**Tabla 8**  
**Sumario de los valores CE50 para el agotamiento autólogo de linfocitos B y producción de citocinas después del tratamiento de PBMC humanas o de mono cinomolgo con DART-A**

<b>PBMC humanas</b>	
Ensayo (número de donantes analizados)	CE50 media (pM)
Agotamiento de linfocitos B humanos (n = 4)	4,20
Liberación de citocinas humanas (n = 2)	
IFN-γ	25,21
TNF-α	31,83
IL-10	70,11
IL-6	23,55
IL-4	No procede*
IL-2	56,77
<b>PBMC de mono cinomolgo</b>	
Agotamiento de linfocitos B de mono cinomolgo (n = 4)	342,8
Liberación de citocinas de mono cinomolgo (n = 2)	
IFN-γ	925,24

(continuación)

<b>Tabla 8</b>	
<b>Sumario de los valores CE50 para el agotamiento autólogo de linfocitos B y producción de citocinas después del tratamiento de PBMC humanas o de mono cinomolgo con DART-A</b>	
TNF- $\alpha$	262,22
IL-6	306,68
IL-5	486,22
IL-4	1718,63
IL-2	2930,19
* por debajo del límite de detección	

<b>Tabla 9</b>			
<b>Sumario de los valores de CE50 para la citotoxicidad frente a la producción de citocinas después de la evaluación <i>in vitro</i> de DART-A en células humanas</b>			
Ensayo CTL <sup>1</sup>	PBMC humanas <sup>2</sup>		
Ensayo (número de donantes)	CE50 media (pM)	Ensayo (número de donantes)	CE50 media (pM)
Citotoxicidad		Agotamiento de linfocitos B autólogos	
HBL-2 (n = 5)	0,11	PBMC (n = 7)	4,20
Raji/GF (n = 5)	0,31		
Jeko-1 (n = 3)	0,15		
Liberación de citocinas (n = 2)		Liberación de citocinas (n = 2)	
IFN- $\gamma$	5,51	IFN- $\gamma$	25,21
TNF- $\alpha$	3,71	TNF- $\alpha$	31,83
IL-2	6,32	IL-6	23,55
Diferencia de veces de CE50 (margen de seguridad indicativo)	12-58	Diferencia de veces de CE50 (margen de seguridad indicativo)	6-8

<sup>1</sup> Actividad evaluada utilizando un ensayo CTL con células tumorales que expresan CD19 (HBL-2, Raji/GF o Jeko-1) en presencia de linfocitos T humanos purificados (E:T = 10:1). La liberación de citocinas se evaluó usando células tumorales Raji/GF.

<sup>2</sup> Actividad evaluada en PBMC humanas normales.

- La liberación de citocinas mediada por **DART-A** por los linfocitos T en presencia de células diana también se investigó.
- 5 Se observó la producción de citocinas dependiente de la dosis de **DART-A** de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 de linfocitos T humanos, con los niveles más altos (Emáx) anotados para IL-2 (> 7000 pg/ml) después de la incubación conjunta con células diana Raji/GF (**Figuras 11A-11C; Tabla 10**). También se produjeron niveles sustanciales de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (~2000-4000 pg/ml). Como se esperaba, la incubación con un diacuerpo de DART de control no dio como resultado ninguna producción detectable de citocinas (**Figuras 11A-11C**). Teniendo en cuenta el valor medio de CE50 para la citocina más sensible producida por linfocitos T humanos purificados (TNF- $\alpha$ ) después de la incubación con **DART-A** en presencia de células diana que expresan CD19 (Raji/GF), en comparación con el valor medio de CE50 para la citotoxicidad de células diana en la línea celular diana menos sensible (Raji/GF), hay al menos un margen de seguridad aparente de 12 veces entre la destrucción de células diana y la producción de citocinas (véase la **Tabla 9** arriba).
- 10

<b>Tabla 10</b>				
<b>Valores de CE50 para la producción de citocinas mediada por DART-A por linfocitos T humanos en presencia de células diana Raji/GF de dos donantes independientes a E:T = 10:1</b>				
	D47067		D44284	
Citocina	CE50 (pM)	Emáx [pg/ml]	CE50 (pM)	Emáx [pg/ml]
IFN- $\gamma$	8,58	3885	2,44	2219
TNF- $\alpha$	6,79	3722	0,626	2361
IL-2	11,31	8496	1,33	7492

**Ejemplo 7****Evaluación de la activación de linfocitos T humanos y de mono cinomolgo mediada por DART-A**

El efecto sobre los linfocitos T durante la lisis de células diana redirigidas (células Raji/GF) mediada por **DART-A** se caracterizó por la evaluación de la expresión de los marcadores de activación de linfocitos T CD69 y CD25. Tanto CD25 como CD69 se regularon positivamente en linfocitos T CD4+ y CD8+ humanos y de mono cinomolgo de forma dependiente de la dosis (**Figuras 12A-12D** y **Figuras 13A-13D**), indicando que la destrucción celular redirigida

5 mediada por **DART-A** se asocia con una activación simultánea de linfocitos T. No se observó activación de linfocitos T en presencia de células JIMT-1 negativas para CD19 (**Figuras 14A-14D**). Estos datos sugieren que la activación de los linfocitos T depende de la captación conjunta de las células diana. Apoyando aún más esta conclusión, el **DART 1 de control** no medió en la inducción de marcadores de activación de linfocitos T (**Figuras 12A-12D** y **Figuras 13A-13D**).

10

#### Ejemplo 8

##### Evaluación del mecanismo de acción de CD19 x CD3

15 Para confirmar que el mecanismo anticipado para la destrucción celular redirigida mediada por CD19 x CD3 por los linfocitos T está mediado por la granzima B y la perforina, se midieron los niveles intracelulares de granzima B y perforina en linfocitos T después de la exposición a **DART-A** o **DART 1 de control** en un ensayo CTL. Se observó una regulación positiva dependiente de la dosis de los niveles de granzima B y perforina en linfocitos T CD8+ y CD4+ después de 24 horas de incubación de linfocitos T humanos con **DART-A** en presencia de células diana Raji/GF en una relación de células E:T de 10:1 (**Figuras 15A-15B**). Por el contrario, no se observó regulación positiva de granzima B o perforina cuando los linfocitos T humanos se incubaron con células diana Raji/GF y **DART 1 de control**. Estos datos apoyan que la destrucción de células diana mediada por **DART-A** puede estar mediada a través de vía de la granzima B y la perforina. Cabe destacar que, la regulación positiva de la granzima B (**Figura 15A**) y de la perforina (**Figura 15B**) fue mayor en los linfocitos T CD8+ en comparación con los linfocitos T CD4+, en coherencia con la potencia de CTL más alta esperada de los linfocitos T CD8+.

20 25

También se evaluó la expansión de los linfocitos T durante la captación conjunta de células efectoras:células diana por CD9 x CD3, dado que se ha notificado anteriormente la proliferación simultánea con la activación de linfocitos T. Los linfocitos T humanos marcados con CFSE se cultivaron conjuntamente con células diana HBL-2 en una relación 30 de células E:T de 10:1 en presencia de **DART-A** o de **DART 1 de control** a una concentración de 200 ng/ml. La proliferación de linfocitos T marcados con CFSE se controló mediante los niveles de dilución de CFSE a lo largo del tiempo mediante análisis de FACS (**Figuras 16A-16B**). La **Figura 16A** muestra los perfiles de tinción de CFSE en presencia de **DART-A** o de **DART 1 de control** y las células diana. La suma de **DART-A** llevó a la proliferación (dilución de CFSE) con aproximadamente un 75 % de las células proliferando después de 72 horas de incubación (**Figura 16B**). 35

35 Por el contrario, no se observó proliferación de linfocitos T marcadas con CFSE en presencia de **DART 1 de control**.

#### Ejemplo 9

##### Eficacia en xenoinjertos mezclados

40 La inhibición del crecimiento del tumor del linfoma de linfocitos B humano por **DART-A** se evaluó en ratones hembra NOD/SCID (n = 8/grupo) inyectados con células tumorales HBL-2 (linfoma de células del manto humano) o Raji (linfoma de Burkitt) mezcladas con linfocitos T humanos activados. En ambos estudios, se combinaron linfocitos T humanos y células tumorales (HBL-2 o Raji) en una relación de 1:5 (1 x 10<sup>6</sup> y 5 x 10<sup>6</sup> células, respectivamente) y se inyectaron SC en ratones el Día 0. Posteriormente, se administraron control de vehículo (células tumorales solas), **DART-A** o **DART 1 de control** IV los Días 0, 1, 2 y 3.

45 Como se muestra en la **Figura 17**, el crecimiento de las células tumorales HBL-2 se inhibió por completo después del tratamiento IV con **DART-A** a niveles de dosis  $\geq 0,2 \mu\text{g/kg}$ . Aunque el tratamiento con 0,02  $\mu\text{g/kg}$  de **DART-A** pareció retrasar el crecimiento de los tumores HBL-2, la respuesta no fue estadísticamente significativa. Los tumores HBL-2 en los grupos de vehículo y **DART 1 de control** alcanzaron un volumen tumoral promedio de aproximadamente 1000 mm<sup>3</sup> el Día 13.

50 55 Como se muestra en la **Figura 18**, no se observó un crecimiento significativo de células tumorales Raji hasta el final del estudio (Día 28) en ratones tratados con **DART-A** en todas las dosis evaluadas (0,8 a 100  $\mu\text{g/kg}$ ). El tratamiento con 0,8  $\mu\text{g/kg}$  de **DART-A** dio como resultado una respuesta completa en 7/8 ratones. Los tumores de Raji en los grupos de vehículo y de **DART 1 de control** demostraron crecimiento tumoral *in vivo* con volúmenes tumorales promedio que alcanzaron los 2449,4  $\pm$  421,1 mm<sup>3</sup> y 2968,2  $\pm$  200,0 mm<sup>3</sup>, respectivamente, al final del estudio el (Día 28).

60

#### Ejemplo 10

##### Eficacia en modelos tumorales establecidos

65 La actividad antitumoral de **DART-A** se evaluó en un modelo de xenoinjerto de HBL-2 (linfoma de células del manto humano) en ratones hembra NSG B2m-/- (n = 8/grupo). A los ratones se les implantaron células tumorales HBL-2 (5

x 10<sup>6</sup> células) por vía intradérmica (ID) el Día 0 seguido de inyección intraperitoneal (IP) de PBMC (5 x 10<sup>7</sup> células) el Día 4. El tratamiento con vehículo, **DART 1 de control** o **DART-A**, administrado IV, se inició el Día 17 cuando los volúmenes tumorales promedio para los grupos que recibieron vehículo, **DART 1 de control** o **DART-A**, fueron 438,4 ± 80,2, 433,7 ± 63,8 y 531,7 ± 122,5 mm<sup>3</sup>, respectivamente. El Día 21 (2<sup>a</sup> administración de dosis), los volúmenes tumorales medios habían aumentado a 1306,1 ± 240,4, 1185,6 ± 138,7 y 958,5 ± 216,1 mm<sup>3</sup> en los grupos tratados con vehículo, **DART 1 de control** y **DART-A**, respectivamente. El Día 24 (3<sup>a</sup> administración de dosis), el volumen promedio del tumor en los grupos de vehículo y **DART 1 de control** había aumentado a 2401,3 ± 397,4 y 2623,7 ± 351,5 mm<sup>3</sup>, respectivamente. Por el contrario, el grupo que recibió **DART-A** había disminuido en volumen en un 45 % a 527,3 ± 148,3 mm<sup>3</sup>. Los tumores en el grupo tratado con **DART-A** continuaron disminuyendo de tamaño, alcanzando por último un volumen final de 111,4 ± 38,9 mm<sup>3</sup> el Día 42, una disminución de un 88,3 % del volumen tumoral máximo observado (**Figura 19A**). En síntesis, el tratamiento con 0,5 mg/kg de **DART-A** dio como resultado la reducción de grandes tumores de linfoma de células del manto HBL-2 establecidos. No se observaron recaídas hasta el Día 42, cuando finalizó el estudio.

Otro grupo de ratones portadores de tumores con un tamaño tumoral promedio de 541 mm<sup>3</sup> (n = 4 ratones) en el Día 14 del estudio fueron programados para tratarlos con 500 µg/kg de **DART-A**. En el momento de la primera dosis (Día 17 de estudio), los tumores habían alcanzado un volumen medio de 2279 ± 61 mm<sup>3</sup> (**Figura 19B**). Sin embargo, antes de la tercera (Día 24 de estudio) y cuarta (Día 28 de estudio) dosis, los volúmenes tumorales fueron de 1469 ± 162 y 848 ± 74 mm<sup>3</sup>, respectivamente, representando un 36% y un 63%, respectivamente, de disminución del volumen tumoral con respecto al volumen máximo registrado el Día 21 del estudio (**Figura 19B**). Los tumores continuaron disminuyendo de tamaño hasta el punto de que el Día 42, el volumen tumoral promedio fue de 248 ± 52 mm<sup>3</sup>, una disminución de un 89 % en el volumen tumoral (**Figura 19B**).

#### Ejemplo 11

##### Estudio toxicocinético de DART-A en monos cinomolgos

Un estudio de toxicología que no cumple con las BPL (buenas prácticas de laboratorio) que se llevó a cabo en monos cinomolgos para evaluar diferentes dosis y regímenes de **DART-A**. La Fase A se realizó 1º para evaluar infusiones IV de 2 horas de dosis crecientes intraanimal de **DART-A** cada semana sucesiva durante 4 semanas, como se sintetiza en la **Tabla 11** (Fase A). La mitad de los monos cinomolgos de la Fase A en cada grupo (1M/1F) se sacrificaron el Día 36 o el Día 64. Posteriormente, la Fase B del estudio se llevó a cabo para evaluar las infusiones IV de 2 horas de **DART-A** administrados en dosis fijas en cada grupo (**Tabla 11**, Fase B). Para los Grupos 3, 4 y 5, se administró la misma dosis (5, 50 o 500 ng/kg, respectivamente) cada semana sucesiva, hasta un total de 3 dosis por animal. Para el Grupo 6, se administraron 500 ng/kg en los Días 1, 4, 8, 11 y 15 de estudio como una infusión IV de 2 horas para un total de 5 dosis por animal. Todos los animales de la Fase B se sacrificaron el Día 18.

**Tabla 11**

##### Diseño Experimental (Fase A)

N.º de Grupo	Macho	Hembra	Material de prueba	Dosis	Día de dosificación del estudio	Nivel de dosis (ng/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)	Concentración de dosis (ng/ml)
1	2	2	Vehículo	1	1	0	0,3	0
			<b>DART-A</b>	2	8	500	0,3	1700
				3	15	5000	0,3	16.700
				4	22	50.000	0,3	166.700
				5	29	50.000	0,3	166.700
2	2	2	<b>DART-A</b>	1	1	0	0,3	0
				2	8	2000	0,3	7000
				3	15	10.000	0,3	33.300
				4	22	100.000	0,3	333.300
				5	29	100.000	0,3	333.300

##### Diseño Experimental (Fase B)

N.º de Grupo	Macho	Hembra	Material de prueba	Dosis	Día de dosificación del estudio	Nivel de dosis real * (ng/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)	Concentración de dosis real (ng/ml)
3	1	1	<b>DART-A</b>	1	1	5	0,3	15,0
				2	8	5	0,3	15,0
				3	15	5	0,3	15,0

(continuación)

Tabla 11

4	1	1	DART-A	1	1	50	0,3	150,0
				2	8	50	0,3	150,0
				3	15	50	0,3	150,0
5	1	1	DART-A	1	1	500	0,3	1500,0
				2	8	500	0,3	1500,0
				3	15	500	0,3	1500,0
6	1	1	DART-A	1	1	500	0,3	1500,0
				2	4	500	0,3	1500,0
				3	8	500	0,3	1500,0
				4	11	500	0,3	1500,0
				5	15	500	0,3	1500,0

\* Se muestra el nivel de dosis real administrado basado en el análisis de las concentraciones de la formulación de dosificación. Se observa que las dosis reales fueron 10 veces menores que los niveles de dosis especificados en el protocolo para la Fase B.

### 1. Un estudio toxicocinético de DART-A en monos cinomolgos (Fase A)

- 5 Se realizó un estudio piloto, no de BPL, exploratorio, de aumento de dosis de **DART-A** en monos cinomolgos. En la Fase A del estudio, se administraron a dos grupos de monos cinomolgos (n = 4/grupo; 2M/2F) dosis crecientes internas de vehículo (Día 1) o de **DART-A** como infusiones IV de 2 horas en los Días 1, 8, 15, 22 y 29. Los monos cinomolgos en el Grupo 1 recibieron control de vehículo → 500 → 5.000 → 50.000 → 50.000 ng/kg de **DART-A**. Los monos cinomolgos en el Grupo 2 recibieron control con vehículo → 2000 → 10.000 → 100.000 → 100.000 ng/kg de **DART-A**. La mitad de los monos cinomolgos de la Fase A de cada grupo (1M/1F) se sacrificaron el Día 36 o el Día 64.

No hubo mortalidad relacionada con **DART-A** durante la Fase A del estudio y no hubo cambios macroscópicos o de peso de órganos relacionados con **DART-A**. Sin embargo, hubo efectos relacionados con **DART-A** a niveles de dosis ≥ 500 ng/kg como se detalla a continuación. Estos efectos resultaron coherentes con la farmacología del artículo de prueba y no se consideraron toxicológicamente significativos.

En la Fase A el Día 36, los hallazgos microscópicos relacionados con **DART-A** se limitaron a los ganglios linfáticos (inguinal, mandibular y mesentérico), bazo y tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés) para todos los animales del Grupo 1 y 2, sin recuperación de hallazgos microscópicos para el Día 64. El Día 36, los hallazgos microscópicos en los ganglios linfáticos y el bazo fueron similares y consistieron en una disminución de moderada a marcada en el número y tamaño de los centros germinales foliculares linfoideos identificados; en el GALT hubo una disminución mínima en el número y tamaño de los centros germinales foliculares linfoideos. El Día 64, los hallazgos relacionados con el artículo de prueba todavía estaban presentes en los ganglios linfáticos, bazo y GALT; en los ganglios linfáticos y el bazo, los hallazgos microscópicos consistieron en una disminución leve a marcada del número y tamaño de los centros germinales foliculares linfoideos y en el GALT hubo una disminución mínima en el número y tamaño de los centros germinales foliculares linfoideos.

La evaluación de la médula ósea (esternón), ganglios linfáticos (inguinales, mandibular y mesentérico) y bazo, por inmunohistoquímica (IHC), reveló un número muy reducido de células positivas para CD20 en animales de la Fase A el Día 36, con solo una recuperación parcial de la tinción de CD20 el Día 64. El Día 36, no hubo tinción positiva para CD20, en general, en la médula ósea o los ganglios linfáticos de los animales de la Fase A, con la excepción de un animal del Grupo 1 en el que estuvo presente una tinción muy rara, leve a moderada, positiva para CD20, en los centros germinales y en la corona de linfocitos, respectivamente, del ganglio linfático inguinal solamente. En el bazo, se identificaron células positivas para CD20 en la pulpa roja solo de 3 animales (1 animal del Grupo 1; 2 animales del Grupo 2) siendo la frecuencia de células positivas para CD20 de muy rara a rara y de intensidad mínima o leve a moderada.

En animales de recuperación (Día 64), se observaron células positivas para CD20, muy rara a ocasionalmente, moderadamente teñidas en la médula ósea de los animales del Grupo 1 únicamente. En los ganglios linfáticos (inguinal, mandibular y mesentérico), solo se identificó tinción positiva para CD20 en un animal del Grupo 1; la frecuencia de células positivas para CD20 generalmente se redujo considerablemente en todos los ganglios linfáticos, si bien la intensidad de tinción de las células positivas fue de moderada a marcada. Se identificaron células positivas para CD20 en el bazo de todos los animales del Grupo 1 y 2. En los animales del Grupo 1, se identificaron células positivas para CD20 en los folículos linfoideos, vainas linfoideas periarteriolares (PALS, por sus siglas en inglés) y pulpa roja en un animal y en las PALS y pulpa roja en otro animal. En los animales del Grupo 2, se identificaron células positivas para CD20, de muy raras a raras, en la pulpa roja solo con una intensidad de tinción leve.

La evaluación del agotamiento de linfocitos B basado en FACS, citocinas y ADA, en la porción de la Fase A de este estudio, se resume a continuación.

**a. Evaluación de FACS para linfocitos B, linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales y monocitos**

- 5 Se recogieron muestras de sangre completa para la evaluación por citometría de flujo de una variedad de subconjuntos de linfocitos y poblaciones de células de monocitos. Los animales de la Fase A se evaluaron la Semana -1; antes de la dosificación los Días 1, 8, 15, 22 y 29; 24 horas posteriores al inicio de la infusión (SOI, por sus siglas en inglés) los Días 2, 9, 16, 23 y 30; 72 horas tras el SOI los Días 4, 11, 18, 25 y 32; Día 35; y los Días 43, 50, 57 y 63 (solo se aplicó a la mitad de los monos cinomolgos de la Fase A de cada grupo con sacrificio de recuperación el Día 64).
- 10 Las reducciones dependientes de la dosis en los recuentos absolutos de linfocitos B (CD20+) estuvieron presentes a partir del Día 9 (24 horas después del SOI) para ambos grupos (Grupos 1 y 2). Las poblaciones de linfocitos B para los animales de 500 ng/kg/dosis (Grupo 1) tendieron hacia los niveles previos al estudio los Días 11 y 15, si bien los 15 valores para los animales de 2000 ng/kg/dosis (Grupo 2) permanecieron reducidos. Los linfocitos B prácticamente se agotaron en el Día 16 (24 horas después del SOI) después de la segunda administración de dosis de **DART-A** para ambos grupos de dosis y permaneció agotado para todos los puntos temporales posteriores (**Figuras 20A-20B**). El agotamiento de linfocitos B fue un efecto farmacológico anticipado de **DART-A**.
- 20 Otras poblaciones de células inmunitarias, incluyendo monocitos, linfocitos citolíticos naturales (NK, por sus siglas en inglés) y linfocitos T, también se evaluaron mediante citometría de flujo.
- 25 Las reducciones transitorias, dependientes de la dosis en el número de monocitos CD14+ estuvieron presentes a partir del Día 9, 24 horas después del SOI, para la mayoría de los animales dosificados a 2.000 ng/kg (Grupo 2). Las 30 reducciones en el número de monocitos CD14+ también estuvieron presentes el Día 16 y el Día 23, 24 horas después del SOI, para la mayoría de los animales dosificados a 5.000 ng/kg y 50.000 ng/kg, respectivamente (Grupo 1) y para todos los animales que recibieron dosis de 10.000 ng/kg y 100.000 ng/kg, respectivamente (Grupo 2). Las poblaciones de monocitos CD14+ se recuperaron rápidamente después del final de cada infusión y en general, alcanzaron o superaron los valores de referencia previos al estudio en el siguiente punto temporal previo a la dosis antes de 35 reducirse nuevamente 24 horas después de las dosis posteriores. Al final de la fase de dosificación, los monocitos CD14+ fluctuaron con valores que tendieron hacia los niveles previos al estudio y mantuvieron valores que estaban en los niveles de referencia previos al estudio o por encima de los mismos.
- 40 También se observaron reducciones dependientes de la dosis transitorias para los linfocitos T totales, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos T reguladores (CD4+/CD25+/FoxP3+), linfocitos NK CD159a+, linfocitos NK CD16+ y linfocitos NK CD16+/CD159a+, observándose las mayores reducciones para los animales con dosis de 2000 ng/kg/dosis (Grupo 2) el Día 9 (24 horas después del SOI) y después de la dosis de 5000 ng/kg/dosis en los animales del Grupo 1 el Día 16 (24 horas después del SOI). Los subconjuntos de linfocitos T y linfocitos NK se recuperaron rápidamente después del final de cada infusión y en general, alcanzaron o excedieron los niveles de referencia previos 45 al estudio antes de la siguiente dosis los Días 15 y 22 antes de reducirse nuevamente 24 horas después de cada dosis. No hubo reducciones adicionales para el Grupo 1 o 2 el Día 30 (24 horas después del SOI) después de las dosis administradas el Día 29.
- 50 Las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ también se evaluaron para la regulación positiva de los marcadores de activación PD-1, TIM-3, CD25 y CD69 para determinar el estado de activación de las células después de la administración de dosis de **DART-A**. Se produjeron aumentos variables en las frecuencias de PD-1+, CD69+ y CD25+ en los linfocitos T CD4+ y de PD-1+ y CD69+ en los linfocitos T CD8+ después de la dosificación, lo que indica un aumento en las frecuencias de linfocitos T CD4+ y CD8+ activados en la sangre completa después de la dosificación. La frecuencia de CD69+, PD-1+ y CD25+ (en menor grado, que ocurre en algunos pero no en todos los animales) en los linfocitos T CD4+ y PD-1+ y CD69+ en los linfocitos T CD8+ aumentó después de las dosis de 500 ng/kg (Grupo 1) y 2000 ng/kg (Grupo 2) a partir del Día 9 (24 horas después del SOI). Estos valores generalmente se mantuvieron por encima de los niveles de referencia y fueron muy variables para todos los puntos temporales posteriores. Los 55 porcentajes relativos de las poblaciones de linfocitos CD25+/CD69+, TIM-3+ y PD-1+/TIM3+ fueron generalmente < 1 % de las poblaciones totales de linfocitos T CD4+ y CD8+, haciendo difícil de evaluar cualquier cambio relacionado con **DART-A**. Colectivamente, estos datos sugieren que la administración de **DART-A** dio como resultado una tendencia ascendente en la expresión de PD-1 y CD69 en los linfocitos T tanto CD4+ como CD8+, junto con un aumento más modesto en CD25+ en los linfocitos T CD4+ en algunos animales, aunque no en todos.

**b. Evaluación de citocinas**

- 60 Los niveles séricos de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (ensayo EMD Millipore) se determinaron antes de la dosis y a las 4 y 24 horas después del inicio de cada infusión. Se observaron aumentos correlacionados con la dosis de **DART-A**, transitorios en los niveles de IL-10 (hasta 1918 pg/ml) 4 horas después del inicio de la infusión cuando se administraron a monos cinomolgos dosis crecientes que variaron entre 500 y 50.000 ng/kg en el Grupo 1 y entre 2000 y 100.000 ng /kg en el Grupo 2 por infusión IV durante un período de 2 horas para las primeras 3 dosis; los niveles generalmente regresaron a los niveles basales en las 24 horas posteriores al inicio de la infusión. En general,

no se detectó IL-10 4 horas después del inicio de la última infusión de **DART-A** en cualquiera de los grupos (50.000 ng/kg en el Grupo 1 o 100.000 ng/kg en el Grupo 2) con una excepción (Animal 2502). El Animal 2502 experimentó un aumento transitorio de IL-10 a 332 pg/ml después de la última dosis (100.000 ng/kg el Día 29), pero este aumento fue menor en magnitud que el aumento de IL-10 después de la primera dosis de 100 µg/kg el Día 22 (570 pg/ml). Un mono cinomolgo (Animal 1001) al nivel de dosis de 50.000 ng/kg, que experimentó los niveles más altos de IL-10 (1918 pg/ml el Día 22), también experimentó aumentos transitorios simultáneos en IL-2 (32 pg/ml), IL-5 (45 pg/ml) e IL-6 (357 pg/ml). Se observaron aumentos transitorios en los niveles de IL-6 en la mayoría de los monos cinomolgos 4 horas después de la infusión de **DART-A**; sin embargo, los aumentos fueron generalmente similares o de menor magnitud (con la excepción del Animal 1001 descrito anteriormente), en comparación con los niveles observados 10 después de la infusión del vehículo de control el Día 1 (hasta 190 pg/ml) sin una clara respuesta a la dosis. No hubo observaciones clínicas aparentes asociadas con niveles elevados de citocinas.

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

## 2. Un estudio toxicocinético de DART-A en monos cinomolgos (Fase B)

En la Fase B del estudio, a 4 grupos de monos cinomolgos (n = 2/grupo; 1M/1F) se les administraron dosis fijas de **DART-A** como infusiones IV de 2 horas con 3 dosis administradas en los Días 1, 8 y 15 para el Grupo 3 (5 ng/kg), Grupo 4 (50 ng/kg) y Grupo 5 (500 ng/kg); y se les administraron 5 dosis los Días 1, 4, 8, 11 y 15 dosis para el Grupo 20 6 (500 ng/kg). Se sacrificaron todos los animales de la Fase B el Día 18.

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

El Día 18, los hallazgos microscópicos relacionados con **DART-A** se limitaron a los ganglios linfáticos (inguinal, 30 mandibular y mesentérico) y el bazo de los animales de los Grupos 4, 5 y 6 y consistieron en una disminución mínima a leve en el número y tamaño de los centros germinales foliculares linfoides identificados sin cambios aparentes en el tamaño y/o densidad celular del tejido linfoide que comprende las PALS en el bazo. No se notificaron hallazgos microscópicos observados en el Grupo 3 (5 ng/kg).

Se evaluaron secciones adicionales de médula ósea (esternón) fijadas en formalina e incluidas en parafina, ganglios linfáticos (inguinales, mandibular y mesentérico) y bazo mediante IHC para poblaciones de células que expresan CD20 (Mordenti, J. et al. (1991) "Interspecies Scaling Of Clearance And Volume Of Distribution Data For Five Therapeutic Proteins", Pharm. Res. 8(11):1351-1359). No hubo una diferencia apreciable en la distribución y/o intensidad de tinción de las células positivas para CD20 en la médula ósea (esternón), ganglios linfáticos (inguinales, mandibular y 40 mesentérico) o bazo en los Grupos 3, 4, 5 o 6. En todos los tejidos, la tinción positiva se asoció con la membrana celular. En general, en la médula ósea se localizaron células positivas para CD20 ocasionales en todo el estroma de la médula ósea y la intensidad de tinción de las células positivas fue de moderada a marcada. En los ganglios linfáticos, las células positivas para CD20 se asociaron principalmente con los centros germinales y la corona de linfocitos de los folículos con menos células positivas para CD20 situadas dentro de la paracorteza, cordones medulares y senos 45 medulares y subcapsulares. La intensidad de la tinción en los centros germinales, corona de linfocitos, cordones medulares y senos medulares y subcapsulares fue de moderada a marcada. La intensidad de la tinción en la paracorteza fue de leve a marcada. En el bazo, las células positivas para CD20 se asociaron principalmente con los centros germinales, manto folicular y zona marginal de folículos linfoides con menos células positivas para CD20 dentro de las PALS y la pulpa roja y la tinción fue de intensidad moderada a marcada.

La evaluación del agotamiento de linfocitos B basado en FACS, citocinas y ADA en la parte de la Fase B de este estudio, se resume a continuación.

### a. Evaluación de FACS para linfocitos B, linfocitos T, linfocitos NK y monocitos

Se recogieron muestras de sangre completa para la evaluación por citometría de flujo de una variedad de subconjuntos de linfocitos y poblaciones de células de monocitos. Los animales de la Fase B se evaluaron en la Semana -1; antes de la dosificación los Días 1, 4, (Grupo 6 solamente) 8, 11 (Grupo 6 solamente) y 15; 24 horas posteriores al SOI los Días 2, 9 y 16; y a las 72 horas tras el SOI los Días 4 y 11 (Grupo 3-5 solamente).

Se observaron reducciones dependientes de la dosis marcadas en el número total de linfocitos B (CD20+) 24 horas después del inicio de la infusión para las dosis administradas los Días 1, 8 y 15. Las mayores reducciones para los grupos de tratamiento de 5 ng/kg (Grupo 3), 50 ng/kg (Grupo 4) y 500 ng/kg (Grupos 5 y 6) se observaron el Día 2 (24 horas tras el SOI). Las poblaciones de linfocitos B se recuperaron rápidamente después de cada infusión en los Grupos 3 y 4 y presentaron valores fluctuantes cerca de los niveles iniciales previos al estudio en todos los demás puntos temporales. Los Grupos 5 y 6 presentaron una recuperación mínima entre dosis y mantuvieron valores generalmente

reducidos en todos los puntos temporales después del Día 2 (**Figuras 21A-21D**). El agotamiento sostenido de linfocitos B fue un efecto farmacológico anticipado de **DART-A** a dosis más altas.

5 Otras poblaciones de células inmunitarias, incluyendo monocitos, linfocitos NK y linfocitos T, también se evaluaron mediante citometría de flujo.

10 Hubo reducciones dependientes de la dosis transitorias para los monocitos CD14+ totales a partir del Día 2 (24 horas tras el SOI) para la mayoría de los animales en todos los grupos de dosis (Grupos 3-6). También hubo cambios adicionales en los monocitos CD14+ para la mayoría de los animales en todos los grupos de dosis los Días 9 y 16 y los valores fueron muy variables.

15 Se observaron reducciones dependientes de la dosis transitorias en el número de linfocitos T totales, linfocitos T reguladores (CD4+/CD25+/FoxP3+), linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y los subconjuntos de linfocitos NK, con las mayores reducciones para todos los grupos (Grupo 3-6) generalmente presentes el Día 2 (24 horas tras el SOI). Los subgrupos de linfocitos T se recuperaron rápidamente después de cada infusión y en general, todas las dosis alcanzaron o superaron los niveles previos al estudio antes de la siguiente infusión en todos los grupos. También estuvieron presentes reducciones adicionales para los linfocitos CD4+, CD8+ y los reguladores, los Días 9 y 16 (24 horas después del SOI) para los animales tratados con dosis de 50 ng/kg (Grupo 4), de 500 ng/kg (Grupo 5) y con dosis múltiples de 500 ng/kg (Grupo 6); sin embargo, las reducciones mostradas en estos puntos temporales fueron de menor magnitud en comparación con las mostradas el Día 2 después de la primera dosis de **DART-A**. Los subconjuntos de linfocitos NK generalmente tendieron a la recuperación después del primer día de infusión y presentaron valores variables en todos los puntos temporales restantes.

20 25 Se evaluó la regulación positiva de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ de los marcadores de activación PD-1, TIM-3, CD25 y CD69 para determinar el estado de activación de las células después de la administración de dosis de **DART-A**. Los porcentajes relativos de CD25+/CD69+ (solo para linfocitos T CD4+), TIM-3+ y PD-1+/TIM3+ en las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ fueron generalmente < 1 % de las poblaciones totales de linfocitos T CD4+ y CD8+, haciendo difícil de evaluar cualquier cambio relacionado con **DART-A**. Los aumentos en las frecuencias de PD-1+ y CD69+ en los linfocitos T CD4+ y CD8+ estuvieron presentes en múltiples puntos temporales para los animales de 500 ng/kg/dosis en los Grupos 5 y 6 a partir del Día 2 (24 horas después del SOI). De manera adicional, hubo aumentos más modestos en la frecuencia de CD25+ en los linfocitos T CD4+ y CD8+ para los animales con dosis de 500 ng/kg (Grupos 5 y 6) a partir del Día 2 (24 horas después del SOI), así como aumentos en los porcentajes relativos de CD25+/CD69+ en linfocitos T CD8+ para los animales tratados con multidosis de 500 ng/kg/dosis (Grupo 6). Los aumentos de una magnitud comparable a los presentes el Día 2 también estuvieron presentes generalmente los Días 9 y 16 (24 horas después del SOI) después de las dosis posteriores. Colectivamente, estos datos indican que la administración de **DART-A** dio como resultado una tendencia ascendente en la expresión de PD-1, CD69 y CD25 en linfocitos T CD4+ y CD8+.

#### b. Evaluación de citocinas

40 45 Los niveles séricos de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (ensayo EMD Millipore) se determinaron antes de la dosificación en los Días -7, 8 y 15; y a las 4 y 24 horas posteriores al inicio de las infusions en los Días 1, 8 y 15. Se observaron aumentos transitorios correlacionados con la dosis en los niveles de IL-10 (hasta 173 pg/ml) 4 horas después del inicio de la 1<sup>a</sup> infusión de **DART-A** cuando se administraron dosis de **DART-A** a monos cinomolgos de 5, 50 o 500 ng/kg (Grupos 3-6); los niveles generalmente regresaron a los niveles basales en las 24 horas posteriores al inicio de la infusión. Los aumentos en IL-10 parecieron ser más pronunciados en todos los grupos después de la 1<sup>a</sup> dosis de **DART-A** en comparación con los aumentos de IL-10 después la 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> dosis (< 22 pg/ml en todos los animales, con la excepción de Animal 5001 descrito a continuación), lo que sugiere una "desensibilización" de la liberación de citocinas y/o una reducción/eliminación rápida de la población de células diana responsables de la activación de los linfocitos T después de la 1<sup>a</sup> dosis. Se observaron aumentos transitorios en los niveles de IL-6 (hasta 162 pg/ml) de forma variable en algunos animales en todos los grupos de dosis 4 horas después del inicio de cada infusión de **DART-A** con niveles que generalmente regresan a los niveles iniciales o cerca de ellos en el transcurso de 24 horas. Sin embargo, basándose en los datos generados a partir de la administración del vehículo en la Fase A en la que se observaron aumentos en los niveles de IL-6 de hasta 190 pg/ml, la fluctuación de los niveles de IL-6 en la Fase B (< 162 pg/ml) puede no reflejar necesariamente las respuestas relacionadas con el fármaco. No se observaron cambios coherentes en los niveles de IL 5, IL-4, IL-2, IFN y o TNF- $\alpha$  durante todo el estudio.

50 55 60 Un mono cinomolgo (Animal 5001) experimentó niveles elevados de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL 5 e IL-10 el Día 8 antes de la 2<sup>a</sup> infusión de **DART-A**. Los niveles de citocinas aumentaron aún más (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) o permanecieron estables (IL-2) 4 horas después de la 2<sup>a</sup> infusión el Día 8. Los niveles de citocinas comenzaron a disminuir 24 horas después de la 2<sup>a</sup> dosis con aumentos variables en algunas citocinas después de la 3<sup>a</sup> infusión de **DART-A** el Día 15. Aunque todos los niveles de citocinas disminuyeron desde sus valores máximos, los niveles de citocinas permanecieron elevados por encima de los niveles de referencia en el último punto temporal evaluado (Día 16) en este mono cinomolgo. No hubo observaciones clínicas aparentes asociadas con niveles elevados de citocinas.

65

**Ejemplo 12****Semivida similar a Ig en ratones transgénicos de FcRn humano**

5 Se realizó un estudio farmacocinético (PK) de FcRn humano de ratón transgénico utilizando la cepa de ratón transgénico de FcRn humano *B6.Cg-Fcgr1tm1Dcr* (CAG-FCGRT) ratón 276Dcr/DcrJ (Número de catálogo 004919), disponible en Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, EE. UU., para evaluar el **DART-A** y el **DART 1 de control (Figura 22)**. La semivida terminal fue de 85,6 y 92,1 horas, respectivamente. También se evaluaron tres mAb humanos en el mismo sistema de prueba para la comparación y tuvieron semividas terminales que variaron entre 58,7 y 102,7 horas.

10

**Ejemplo 13****Eficacia en modelos de leucemia/linfoma de células Raji diseminada en ratones reconstituidos con PBMC humanas**

15

15 Se establecieron modelos de tumores diseminados utilizando células de linfoma Raji transducidas con luciferasa (Raji.luc) en ratones hembra NSG B2m-/- reconstituidos con PBMC humanas en las que los ratones se trataron con vehículo, **DART 1 de control** o **DART-A**, un día después de la inyección de células tumorales (el "tratamiento temprano" o el paradigma de la leucemia) o después de al menos dos semanas de crecimiento *in vivo* (el modelo de "tumor establecido" o linfoma).

20

**Modelo de tratamiento temprano**

25 Después de la reconstitución con PBMC humanas el Día -14 de estudio, se inyectaron células de linfoma Raji.luc el Día 0 del estudio y se inició el tratamiento al día siguiente (Día 1 del estudio). Se inyectó control de vehículo, 0,5 mg/kg de **DART 1 de control** o 0,5 mg/kg **DART-A** IV una vez cada 3-4 días para un total de 12 dosis (es decir, Días 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25 y 27 de estudio). Se siguió la supervivencia de los ratones hasta el Día 54 del estudio o Día 56 del estudio.

30 30 En los grupos que reciben vehículo o **DART 1 de control**, los perfiles de células tumorales diseminadas difusas se fusionaron y expandieron rápidamente en la mayoría de los ratones en las Semanas 2 y 3. Se observaron muertes de animales en estos dos grupos de control tan tempranas como en dos semanas después del implante de células tumorales. Todos los ratones en los grupos de vehículo o de **DART 1 de control** murieron o se les sacrificó humanitariamente (es decir, si los animales agonizaron o perdían más del 15 % de su peso corporal) los Días 40 o 53 de estudio, respectivamente. Las curvas de supervivencia se representan en la **Figura 23**. Por el contrario, el grupo tratado con **DART-A** no mostró crecimiento de células tumorales en ningún momento y no se observaron muertes de animales hasta el final del estudio. La curva de supervivencia se representa en la **Figura 23**.

40 40 Se realizó un estudio de búsqueda de intervalo de dosis en un experimento de seguimiento en las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente, excepto que se inyectaron 0,16 ng/kg, 0,8 ng/kg, 4 µg/kg, 20 µg/kg, 0,1 mg/kg o 0,5 mg/kg de **DART-A** IV una vez cada 3-4 días para un total de 12 dosis (es decir, Días 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25 y 27 de estudio). Se administraron vehículo y **DART 1 de control** como se ha descrito anteriormente en los mismos días de estudio. Se observó una rápida progresión del crecimiento del tumor Raji.luc en ratones tratados con vehículo o **DART 1 de control**. **DART-A** demostró eficacia en todas las dosis probadas con la mayoría de los ratones vivos (>8 %) y libres de tumores al final del estudio (Día 56) a dosis tan bajas como 20 µg/kg (**Figura 24**).

45

**Modelo de tumor establecido**

50 50 La capacidad de CD19 x CD3 para controlar la carga tumoral de las células Raji.luc cuando se retrasó el tratamiento, se ensayó en un conjunto separado de experimentos. En el modelo tumoral establecido, se inocularon ratones reconstituidos con PBMC humanas IV con células Raji.luc del Día 0 de estudio (aproximadamente una semana después de la inyección de PBMC) y se les permitió crecer durante 14 días antes del inicio del tratamiento.

55 55 Los ratones se aleatorizaron el Día 12 de estudio en 3 grupos en función de la carga tumoral y posteriormente, se les trató con vehículo, 0,1 mg/kg de **DART-A** o 0,5 mg/kg de **DART-A** a partir del Día 14 de estudio (2 semanas después de la inoculación de células Raji.luc) para un total de 10 dosis (es decir, Días 14, 15, 16, 19, 21, 23, 30, 33, 35 y 37 de estudio). En el grupo de control de vehículo, los focos iniciales aumentaron notablemente en tamaño al final de la primera semana de tratamiento y 5/7 ratones murieron en el transcurso de 2 semanas posteriores al inicio del tratamiento (**Figura 25**). Por el contrario, la carga tumoral en la mayoría de los animales en ambos grupos de tratamiento de **DART-A** se redujo drásticamente o se eliminó durante la primera semana de tratamiento. Solo un animal en cada grupo de tratamiento de **DART-A**, cada uno con una carga tumoral relativamente alta presente en la aleatorización, murió durante la primera semana de tratamiento (**Figura 25**). Para el Día 50 de estudio, solo 2 ratones en el grupo de tratamiento de 0,1 mg/kg de **DART-A** tuvieron tumores periféricos restantes.

65 65 Se llevó a cabo un estudio de determinación del intervalo de dosis en el modelo de tratamiento retardado en las condiciones experimentales generales descritas anteriormente. En este experimento, se inocularon ratones

reconstituidos con PBMC humanas por vía IV con células Raji.luc el Día 0 de estudio (5 días después de la inyección de PBMC) y se les permitió crecer hasta el Día 14 de estudio antes de la aleatorización. El tratamiento se inició el Día 15 del estudio con vehículo, 0,1 mg/kg de **DART 1 de control** o 0,16 µg/kg, 0,8 µg/kg, 4 µg/kg, 20 µg/kg, 0,1 mg/kg o 0,5 mg/kg de **DART-A** para un total de 9 dosis (es decir, Días 15, 17, 21, 23, 25, 28, 30, 32 y 35 de estudio).

5 En el grupo de control de vehículo, la carga tumoral aumentó progresivamente y todos los ratones murieron o fueron sacrificados al final de la segunda semana de tratamiento (**Figura 26**). Los ratones tratados con 0,1 mg/kg de **DART 1 de control** mostraron un ligero retraso en la progresión del tumor, en comparación con los ratones tratados con vehículo (**Figura 26**). Por el contrario, la carga tumoral en los animales tratados con **DART-A** mostró una reducción 10 generalmente dependiente de la dosis con el tiempo (**Figura 26**).

#### Ejemplo 14

##### Farmacocinética de DART-A en monos cinomolgos

15 El mono cinomolgo se seleccionó como un modelo farmacológico adecuado para el análisis de **DART-A** basado en la distribución equivalente de ambos antígenos diana en esta especie en comparación con humanos, basándose en la inmunohistoquímica con los mAb precursores.

20 El estudio realizado de acuerdo con la presente descripción incluyó 5 grupos de tratamiento, que consisten en 10 monos cinomolgos por grupo (5 machos, 5 hembras). Los grupos fueron tratados con infusión IV durante 2 horas con control de vehículo para la primera infusión el Día 1, seguido de tratamiento con control de vehículo (Grupo 1) o **DART-A** (Grupos 2-5) una vez por semana durante cuatro semanas. Si bien los animales del Grupo 1 continuaron recibiendo control de vehículo para las 4 infusiones posteriores, los animales de los Grupos 2-5 recibieron **DART-A** a 0,2 µg/kg, 25 2 µg/kg, 5 µg/kg o 10 µg/kg para todas las infusiones posteriores los Días 8, 15, 22 y 29 (**Tabla 12**). Se sacrificaron 3 machos y 3 hembras y se les realizó la necropsia el Día 37, si bien se sacrificó a los monos restantes del grupo de recuperación (2 machos y 2 hembras) y se les sometió a necropsia el Día 121 después de un período de recuperación de 12 semanas.

Tabla 12

Estudio de infusión n.º	N.º de infusión de DART-A (solo Grupos 2-5)	Día de estudio	DART-A (µg/kg) administrado como una infusión IV de 2 horas				
			Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
1	ND	1	0	0	0	0	0
2	1	8	0	0,2	2	5	<b>10</b>
3	2	15	0	0,2	2	5	10
4	3	22	0	0,2	2	5	10
5	4	29	0	0,2	2	5	10

30 El análisis de concentración de **DART-A** en suero recogido en varios puntos temporales se llevó a cabo con ELISA. El perfil de concentración sérica-tiempo de **DART-A** para un animal representativo del Grupo 5 se muestra en la **Figura 27**. Los parámetros PK (modelo de dos compartimentos) se estimaron tras las dosis de 0,2, 2, 5 y 10 µg/kg (**Tabla 13**). En general, los aumentos proporcionales a la dosis en las concentraciones séricas máximas ( $C_{\text{máx}}$ ) y las  $AUC_{\text{inf}}$  se 35 observaron en todo el intervalo de dosis evaluado. Aunque existían diferencias para varias comparaciones de dosis por pares de parámetros farmacocinéticos primarios, en su conjunto, no hubo tendencias coherentes en los cambios en el aclaramiento (CL), el aclaramiento intercompartimental (CLD<sub>2</sub>) y los volúmenes de distribución ( $V_1$  y  $V_2$ ) por **DART-A** a través de las dosis evaluables que sugieren una PK lineal. Los valores de CL en los animales de los Grupos 2-5 son más bajos que la tasa de filtración glomerular (TFG) para los monos cinomolgos (~125 ml/h/kg), lo que indica 40 que prácticamente no se produce eliminación por filtración renal, como sería de esperar para una proteína de este peso molecular (109,3 kDa). Los volúmenes iniciales medios de distribución ( $V_1$ ) para animales de los Grupos 2, 3, 4 y 5, son similares o ligeramente mayores que el volumen de plasma en monos cinomolgos (~45 ml/kg), sugiriendo poco agotamiento de **DART-A** en el compartimiento central por unión a las células diana. Las semividas medias de la fase beta y la TRM mostraron una tendencia creciente con el aumento de la dosis, con una semivida beta media ( $t_{1/2}$ ,  $\beta$ ) que fue de 161 horas (6,7 días) y un tiempo de residencia medio (TRM) de 191 horas (8 días). Es de destacar que 45 solo tres animales del estudio de BPL ( $n = 1$  en el grupo de dosis de 2 µg/kg;  $n = 2$  en el grupo de dosis de 5 µg/kg) tuvieron perfiles farmacocinéticos aberrantes después de la 2<sup>a</sup> y siguientes infusiones de **DART-A** ( $n = 2$ ) o después de la cuarta infusión de **DART-A** ( $n = 1$ ) y posteriormente fueron confirmados como positivos para ADA. Por tanto, los 50 datos de concentración sérica después de los ciclos de infusión afectados se excluyeron del modelo PK para estos 3 animales.

Tabla 13 Análisis de dos compartimentos de los parámetros PK de DART-A en monos cinomolgos				
Atributo	0,2 µg/kg/d (media ± DT)	2 µg/kg/d (media ± DT)	5 µg/kg/d (media ± DT)	10 µg/kg/d (media ± DT)
Cmáx (ng/ml)	3,18 ± 0,46	31,9 ± 3,0	82,9 ± 5,6	166,6 ± 11,0
AUC <sub>inf</sub> (h·ng/ml)	155 ± 37	2258 ± 634	6714 ± 1846	13756 ± 2534
CL (ml/h/kg)	0,95 ± 0,17	0,80 ± 0,22	0,73 ± 0,24	0,70 ± 0,13
CLD <sub>2</sub> (ml/h/kg)	0,87 ± 0,15	1,65 ± 0,36	1,70 ± 0,74	1,40 ± 0,40
V <sub>1</sub> (ml/kg)	43,4 ± 5,8	50,9 ± 5,1	52,3 ± 3,5	54,5 ± 4,5
V <sub>2</sub> (ml/kg)	65,3 ± 17,5	77,9 ± 17,9	93,4 ± 33,3	105,3 ± 33,0
V <sub>ss</sub> (ml/kg)	108,7 ± 16,6	128,8 ± 17,2	145,8 ± 34,6	159,8 ± 36,0
t <sub>1/2</sub> (h)	14,0 ± 1,5	11,0 ± 2,2	12,3 ± 3,8	15,0 ± 4,4
t <sub>1/2, β</sub> (h)	119,1 ± 27,6	143,4 ± 43,4	184,9 ± 72,0	205,6 ± 66,9
MRT (h)	116,3 ± 20,3	173,0 ± 54,5	221,2 ± 86,5	235,9 ± 72,0

#### Liberación de citocinas en monos cinomolgos tratados con DART-A

- 5 Se recogieron muestras de suero para evaluar los niveles de citocinas antes de la infusión y a las 2 y 22 horas después del final de la infusión los Días 1, 8, 15, 22 y 29. Las citocinas evaluadas fueron TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10.
- 10 Se observó un aumento en los niveles de IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  después de la primera infusión de **DART-A** (Día 8), con respecto al mayor aumento en los niveles de citocinas que se producen 2 horas después del final de la infusión. Se observó un aumento dependiente de la dosis de **DART-A** para IL-10 e IFN- $\gamma$  a niveles de dosis >2 mg/kg, si bien se observó un aumento de IL-6 a niveles de dosis  $\geq$ 5 mg/kg. Los cambios en los niveles de TNF- $\alpha$  fueron pequeños y solo se observaron en el nivel de dosis más alto (10 mg/kg). Los cambios en los niveles de citocinas fueron transitorios y regresaron al valor inicial o cerca del mismo en el transcurso de las 24 horas posteriores al inicio de la infusión y no hubo observaciones clínicas asociadas con estos niveles elevados de citocinas. Las infusiones posteriores de **DART-A** los Días 15, 22 y 29 dieron como resultado unos aumentos más pequeños del nivel de citocinas, generalmente comparables a los observados después de la infusión del control de vehículo. Los niveles medios de IL-2, IL-4 e IL-5 mostraron cambios variables y aislados en animales individuales, pero permanecieron <20 pg/ml en todos los grupos a lo largo de la duración del estudio y no se consideraron toxicológicamente significativos.
- 15 20 Los niveles de citocinas en animales que recibieron 0,2 mg/kg de **DART-A** resultaron comparables a las variaciones observadas después de la infusión del control de vehículo (Grupo 1).

#### Agotamiento de linfocitos B circulantes mediado por DART-A en monos cinomolgos

- 25 Los niveles absolutos circulantes de linfocitos B, de linfocitos T, incluyendo los subconjuntos de linfocitos T (CD4 frente a CD8) y los marcadores de activación (CD25, CD69, PD-1 y TIM-3) y de linfocitos NK, se midieron a lo largo del estudio como criterio de valoración farmacodinámico. Las muestras se recogieron antes de la infusión y a las 2, 22 y 70 horas después del final de la infusión los Días 1, 8, 22 y 29, antes de la necropsia terminal el Día 37 y a continuación, semanal o quincenalmente durante el período de recuperación, los Días 36, 43, 50, 57, 64, 78, 92, 106 y 119.

- 30 35 La **Figura 28** muestra que el tratamiento de **DART-A** dio como resultado un agotamiento dependiente de la dosis de linfocitos B CD20+, la población diana prevista. Se observó un agotamiento completo o casi completo de las células CD20+ a las 24 horas del comienzo de la primera infusión de **DART-A** a niveles de dosis  $\geq$  2 mg/kg. El agotamiento de los linfocitos B CD20+ fue duradero durante todo el período de tratamiento y se mantuvo durante 3-5 semanas después de la dosis final. Hubo un retorno dependiente de la dosis a los niveles previos a la dosis de linfocitos B CD20+ durante las últimas semanas del período de recuperación de 12 semanas.

#### Ejemplo 15

#### Agotamiento autólogo de linfocitos B malignos en muestras primarias de pacientes con LLC

- 40 45 Para evaluar la actividad citolítica mediada por **DART-A** en muestras primarias de pacientes con LLC, se incubaron PBMC de pacientes con **DART-A** o **DART 1 de control**. Debido a la disponibilidad limitada de muestras de pacientes, solo se probaron 2 concentraciones (50 ng/ml y 200 ng/ml). Los porcentajes de linfocitos B malignos de LLC (CCD19+/CD5+ o CD20+/CD5+) y linfocitos T (CD19-/CD5+ o CD4+ y CD8+) se midieron mediante citometría de flujo antes del tratamiento y después del tratamiento durante 3 y 6 días. El **DART-A** a las concentraciones probadas bloquea

parcialmente la tinción del anticuerpo anti-CD 19, por tanto, no resultó adecuado usar CD19+/CD5+ para seleccionar los linfocitos B malignos después del tratamiento con **DART-A**. Por tanto, el agotamiento de los linfocitos B malignos se determinó seleccionando las células CD20+/CD5+ después del tratamiento con **DART-A**.

- 5 La relación E:T determinada a partir de las frecuencias de linfocitos B malignos de LLC y de linfocitos T fue generalmente  $\leq 1:10$ . En el experimento de donante con LLC representativo mostrado, la relación de células E:T fue de aproximadamente 1:23 antes del tratamiento basado en linfocitos T CD19-/CD5+ que comprenden solo un 4 % del total de PBMC y aproximadamente un 90 % de las PBMC identificadas como linfocitos B malignos CD19+/CD5+. Las **Figuras 29A-29I** y la **Tabla 14** muestran los efectos del tratamiento de **DART-A** en comparación con la muestra de pacientes con LLC. La incubación de **DART-A** con PBMC de LLC dio como resultado en un agotamiento dependiente del tiempo de los linfocitos B malignos en ambas concentraciones de **DART-A** evaluadas, acompañado de un aumento simultáneo en linfocitos T (CD4 y CD8) observado el Día 6. Además, el marcador de activación de linfocitos T CD25 se reguló positivamente después del tratamiento de **DART-A** durante 6 días, indicando que el **DART-A** induce la activación de linfocitos T en el proceso de destrucción redirigida de los linfocitos B malignos. Por el contrario, no se observó destrucción de linfocitos B ni regulación positiva de CD25 con el **DART 1 de control** hasta el Día 6.
- 10
- 15

Cabe destacar que, el **DART-A** medió el mismo nivel de destrucción en ambas concentraciones evaluadas, pero el nivel de destrucción aumentó con el tiempo, con aproximadamente un 40 % y un 85 % de los linfocitos B malignos destruidos el Día 3 y el Día 6, respectivamente, lo que sugiere que el tiempo es el factor crítico para la eliminación eficaz de las células diana en bajas relaciones de linfocitos T respecto a células diana cuando hay suficiente **DART-A** presente.

20

Tabla 14 Porcentajes de linfocitos B malignos (CD20+/CD5+), linfocitos T (CD4, CD8+) y linfocitos T activados (CD25+/CD4+ y CD25+/CD8+) en PBMC de LLC (E:T = 1:23) después del tratamiento con DART-A o DART 1 de control durante 3 y 6 días					
Punto temporal	Porcentajes (%)				
	CD20+/CD5+	CD4+	CD8+	CD25+/CD4+	CD25+/CD8+
<b>Día 0</b>					
Pretratamiento	70,7	s.d. <sup>1</sup>		Los subconjuntos de linfocitos T CD4+ y CD8+ no se midieron el Día 0. Se utilizó CD19-/CD5+ para definir la población de linfocitos T el Día 0 (4 %) como se ha descrito anteriormente.	
<b>Día 3</b>					
<b>DART-A</b> (50 ng/ml)	40,5	1,01	1,78	Los porcentajes generales de linfocitos T fueron demasiado bajos (<5 %) para evaluar el marcador de activación de linfocitos T CD25 el Día 0 o el Día 3.	
<b>DART 1 de control</b> (50 ng/ml)	73,5	3,08	1,81		
<b>DART-A</b> (200 ng/ml)	42,3	1,61	1,68		
<b>DART 1 de control</b> (200 ng/ml)	72,9	3,23	1,62		
<b>Día 6</b>					
<b>DART-A</b> (50 ng/ml)	11,3	57,4	22,2	87,7	82,8
<b>DART 1 de control</b> (50 ng/ml)	74,9	3,54	2,26	1,4	20,6
<b>DART-A</b> (200 ng/ml)	12,3	65,2	20,9	91,6	90,7
<b>DART 1 de control</b> (200 ng/ml)	73,4	2,79	1,82	1,4	14,3

#### LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> MacroGenics, Inc. Johnson, Leslie Bonvini, Ezio Lam, Chia-Ying Kao Moore, Pablo Liu, Liqin Koenig, Scott
- <120> Diacuerpos monovalentes biespecíficos que son capaces de unirse a CD19 y CD3 y usos de los mismos
- 30 <130> 1301.0116PCT
- <150> US 62/0255,695
- <151> 26/09/2014
- <160> 48
- 35

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido espaciador intermedio (Enlazador 1)

10

<400> 1

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
1 5

15

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Enlazador 2

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly  
1 5

25

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador que contiene cisteína

35

<400> 3

Gly Gly Cys Gly Gly Gly  
1 5

40

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> Dominio bisagra de IgG1

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

50

<210> 5

<211> 13

55

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Espaciador-enlazador 3

60

<400> 5

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

5 <210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Dominio promotor de heterodímeros

<400> 6

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 1 5

15 <210> 7  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Dominio promotor de heterodímeros

<400> 7

25 Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 1 5

<210> 8  
 <211> 7  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Dominio promotor de heterodímeros

35 <400> 8

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 1 5

40 <210> 9  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Dominio promotor de heterodímeros

<400> 9

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 1 5

50 <210> 10  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Dominio promotor de heterodímeros de espiral E

60 <400> 10

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
 20 25

5 <210> 11

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Dominio promotor de heterodímeros de espiral K

<400> 11

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val  
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
 20 25

15

<210> 12

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Dominio promotor de heterodímeros de espiral E que contiene cisteína

25 <400> 12

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
 20 25

30 <210> 13

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Dominio promotor de heterodímeros de espiral K que contiene cisteína

<400> 13

Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val  
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
 20 25

40

<210> 14

<211> 217

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 935 062 T3

<220>  
<221> MISC\_FEATURE

5 <223> Dominio CH2-CH3 de IgG1 humana

<400> 14

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

10

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
210 215

ES 2 935 062 T3

<210> 15  
<211> 217  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Dominio CH2-CH3 "portador del botón"

10 <400> 15

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

ES 2 935 062 T3

50

55

60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
210 215

<210> 16

<211> 217

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio CH2-CH3 "portador del ojal"

10

<400> 16

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln  
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 210 215

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Cadena ligera variable del anticuerpo anti-CD19

ES 2 935 062 T3

<400> 17

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp His Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CDR1 de la cadena ligera variable del anticuerpo anti-CD19

15

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met His  
1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> CDR2 de la cadena ligera variable del anticuerpo anti-CD19

25

<400> 19

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ser  
1 5

30

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> CDR3 de la cadena ligera variable del anticuerpo anti-CD19

ES 2 935 062 T3

<400> 20

Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr  
1 5

5

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cadena pesada variable del anticuerpo anti-CD19

<400> 21

15

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
65 70 75 80

Phe Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 22

<211> 7

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada variable del anticuerpo anti-CD19

25

<400> 22

Thr Ser Gly Met Gly Val Gly  
1 5

30

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 de la cadena pesada variable del anticuerpo anti-CD19

5

<400> 23

His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ala	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada variable del anticuerpo anti-CD19

<400> 24

Met	Glu	Leu	Trp	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr						
1				5					10						

20

<210> 25

<211> 110

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera variable del anticuerpo anti-CD3

30

<400> 25

Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly
1					5				10					15	

Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser
20								25						30	

Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Gly
35							40				45				

Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Trp	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe
50					55					60					

Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala
65					70					75				80	

Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn
								85			90		95		

Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly			
100						105					110				

35

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR1 de la cadena ligera variable del anticuerpo anti-CD3

5 <400> 26

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn  
1 5 10

10 <210> 27  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> CDR2 de la cadena ligera variable del anticuerpo anti-CD3  
<400> 27

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro  
1 5

20 <210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> CDR3 de la cadena ligera variable del anticuerpo anti-CD3  
<400> 28

30 Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val  
1 5

35 <210> 29  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Cadena pesada variable del anticuerpo anti-CD3  
<400> 29

ES 2 935 062 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 30

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada variable del anticuerpo anti-CD3

10 <400> 30

Thr Tyr Ala Met Asn  
1 5

15 <210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> CDR2 de la cadena pesada variable del anticuerpo anti-CD3

<400> 31

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser  
1 5 10 15

25 Val Lys Gly

<210> 32

<211> 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

5 &lt;223&gt; CDR3 de la cadena pesada variable del anticuerpo anti-CD3

&lt;400&gt; 32

1	5	10											
His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr

10

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

15

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Enlazador 4

&lt;400&gt; 33

20

1	Gly	Gly	Gly	Ser
---	-----	-----	-----	-----

25

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 46

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

30

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Dominio de unión a albúmina (ABD)

&lt;400&gt; 34

1	5	10	15												
Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Gly

20	25	30													
Val	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Leu	Ile	Asp	Asn	Ala	Lys	Ser	Ala	Glu

35	40	45											
Gly	Val	Lys	Ala	Leu	Ile	Asp	Glu	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro

35

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 502

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

40

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primera cadena polipeptídica de DART-A

&lt;400&gt; 35

ES 2 935 062 T3

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp His Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu

## ES 2 935 062 T3

65

70

75

80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Gly  
 100 105 110

Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
 115 120 125

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 130 135 140

Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 145 150 155 160

Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr  
 165 170 175

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys  
 180 185 190

Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala  
 195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser  
 210 215 220 225

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
 225 230 235 240

Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu  
 245 250 255

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
 260 265 270

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 275 280 285

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 290 295 300

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 305 310 315 320

ES 2 935 062 T3

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
325 330 335

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
340 345 350

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
355 360 365

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
370 375 380

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
385 390 395 400

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
405 410 415

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
420 425 430

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
435 440 445

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
450 455 460

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
465 470 475 480

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
485 490 495

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
500

<210> 36

<211> 1506

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica DART-A (SEQ ID NO: 35)

10

<400> 36

gagaatgtgc	tcacacagtc	ccctgcaact	ctgagcgtaa	ctccagggga	gaaggccacc	60
atcacgtgta	gaggctccca	gagtgtgagc	tacatgcact	ggtatcagca	gaaacctgga	120
caagctccca	ggttgctgat	ctatgacgct	agcaaccggg	ctagtggcgt	tccatcccg	180
ttttctggct	caggatctgg	cactgaccac	accctcacca	tatccagcct	tgaagccgaa	240
gatgccgcaa	cctactactg	cttcagggg	agtgtgtatc	cttcacatt	cggtcagggt	300
acaaagctgg	agattaaggg	tggaggatcc	ggcggcggag	gcgaggtgca	gttgtggag	360
tctggggag	gcttggtcca	gcctggaggg	tccctgagac	tctcctgtgc	agcctctgga	420
ttcaccttca	gcacatacgc	tatgaattgg	gtccgccagg	ctccagggaa	ggggctggag	480
tgggttggaa	ggatcaggtc	caagtacaac	aattatgcaa	cctactatgc	cgactctgtg	540
aaggtagat	tcaccatctc	aagagatgat	tcaaagaact	cactgtatct	gcaaataaac	600
agcctgaaaa	ccgaggacac	ggccgtgtat	tactgtgtga	gacacggtaa	cttcggcaat	660
tcttacgtgt	cttggtttgc	ttattgggg	caggggacac	tggtgactgt	gtttccgccc	720
tccaccaagg	gcgaagtggc	cgcacgtgag	aaagaggttg	ctgctttgga	gaaggaggtc	780
gctgcacttg	aaaaggaggt	cgcagccctg	gagaaaggcg	gcggggacaa	aactcacaca	840
tgcccacgt	gcccagcacc	tgaagccgcg	gggggaccgt	cagtcttcct	cttccccca	900
aaacccaagg	acaccctcat	gatctccgg	accctgagg	tcacatgcgt	ggtgtggac	960
gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcac	1020
aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	1080
ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggctgaat	ggcaaggagt	acaagtgcac	ggtctccaac	1140
aaagccctcc	cagccccat	cgagaaaacc	atctccaaag	ccaaaggca	gccccgagaa	1200
ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccg	gaggagatga	ccaagaacca	ggtcagcctg	1260
tggtgcttgg	tcaaaggctt	ctatccagc	gacatgcgg	tggagtggga	gagcaatggg	1320
cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	cccgtctgg	actccgacgg	ctccttcttc	1380
ctctacagca	agctcaccgt	ggacaagagc	aggtggcagc	agggaaacgt	tttctcatgc	1440
tccgtatgc	atgaggctct	gcacaaccac	tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctcag	1500
ggtaaa						1506

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 271

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Segunda cadena polipeptídica de DART-A

10

&lt;400&gt; 37

ES 2 935 062 T3

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

ES 2 935 062 T3

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly  
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala  
115 120 125

Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly  
130 135 140

Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro  
145 150 155 160

Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp  
165 170 175

Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp  
180 185 190

Thr Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val  
195 200 205

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr  
210 215 220

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
225 230 235 240

Thr Lys Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys  
245 250 255

Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
260 265 270

<210> 38

<211> 813

<212> ADN

ES 2 935 062 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la segunda cadena polipeptídica de DART-A (SEQ ID NO: 37)

5

<400> 38

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggAAC tgtgaccctg 60  
acatgcagat ccagcacagg cgcaGtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120  
aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc ggggttacaa acaaaaggc tccctggacc 180  
cctgcacggt tttcttggaaag tctgtggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240  
caggcccagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtttc 300  
gggggtggca caaaactgac tgtgtggga ggggtggat ccggcggagg tggacaggtg 360  
acactgaggg aatctggtcc agctctggtg aaacccactc agacgctcac tctcaacttgc 420  
accttttagtg ggttctcaact gtccacatct ggcattggag taggctggat tcgacagcca 480  
cctggaaag ccttggagtg gcttgcac atctggtggg atgacgacaa gcggtaataat 540  
cccgcaactga agagcagact gaccatcagc aaggatacat ccaagaacca ggtgtttctg 600  
accatgacca acatggaccc tgtcgataca gccacctact atttgctcg catggagttg 660  
tggtcctact acttcgacta ttggggacaa ggcacaacccg tgactgtctc atccgcctcc 720  
accaaggcga aagtggccgc atgttaaggag aaagttgctg ctttgaaga gaaggtcgcc 780  
gcacttaagg aaaaggtcgc agccctgaaa gag 813

10

<210> 39

<211> 227

<212> PRT

<220>  
<223> Tercera cadena polipeptídica de DART-A  
<400> 39

ES 2 935 062 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val  
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
210 215 220

Pro Gly Lys  
225

<210> 40  
<211> 681  
<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido que codifica la tercera cadena polipeptídica de DART-A  
 <400> 40

gacaaaactc	acacatgccc	accgtgcccc	gcacctgaag	ccgcgggggg	accgtcagtc	60
tccctcttcc	ccccaaaacc	caaggacacc	ctcatgatct	cccgaccccc	tgaggtcaca	120
tgcgtggtgg	tggacgtgag	ccacgaagac	cctgaggtca	agttcaactg	gtacgtggac	180
ggcgtggagg	tgcatataatgc	caagacaaag	ccgcggggagg	agcagtacaa	cagcacgtac	240
cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaatggcaa	ggagtacaag	300
tgcaaggct	ccaaacaaagc	cctcccagcc	cccatcgaga	aaaccatctc	caaagccaaa	360
gggcagccccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgccccat	cccgggagga	gatgaccaag	420
aaccaggta	gcctgagttg	cgcagtcaaa	ggcttctatc	ccagcgacat	cgccgtggag	480
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgcctccgt	gctggactcc	540
gacggctcct	tcttcctcg	cagcaagctc	accgtggaca	agagcaggtg	gcagcagggg	600
aacgtcttct	catgctccgt	gatgcatgag	gctctgcaca	accgctacac	gcagaagagc	660
ctctccatgt	ctccggtaa	a				681

10 <210> 41  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Dominio de cadena ligera variable del anticuerpo anti-fluoresceína 4-4-20  
 <400> 41

ES 2 935 062 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 42

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de cadena pesada variable del anticuerpo anti-fluoresceína 4-4-20

10 <400> 42

ES 2 935 062 T3

Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp  
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser  
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 43

<211> 508

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Primera cadena polipeptídica del DART 1 de control

10 <400> 43

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

ES 2 935 062 T3

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly  
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala  
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn  
165 170 175

Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile  
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu  
195 200 205

Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe  
210 215 220

Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu  
245 250 255

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu  
260 265 270

Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
275 280 285

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
290 295 300

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
305 310 315 320

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
325 330 335

ES 2 935 062 T3

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
340 345 350

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
355 360 365

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
370 375 380

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
385 390 395 400

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
405 410 415

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly  
420 425 430

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
435 440 445

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
450 455 460

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
465 470 475 480

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
485 490 495

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
500 505

<210> 44

<211> 269

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Segunda cadena polipeptídica del DART 1 de control

10

<400> 44

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

ES 2 935 062 T3

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly  
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly  
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Arg Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly  
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu  
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr  
165 170 175

Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
180 185 190

Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val  
195 200 205

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp  
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys  
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
260 265

<210> 45  
<211> 495  
<212> PRT

ES 2 935 062 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Primera cadena polipeptídica del DART 2 de control

5

<400> 45

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp His Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Gly  
100 105 110

Gly Gly Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Leu Val Gln Pro  
115 120 125

Gly Arg Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
130 135 140

Asp Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu  
145 150 155 160

Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr  
165 170 175

Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys  
180 185 190

Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Met Gly  
195 200 205

Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
210 215 220

ES 2 935 062 T3

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala  
225 230 235 240

Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu  
245 250 255

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Asp Lys Thr His  
260 265 270

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
275 280 285

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
290 295 300

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
305 310 315 320

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
325 330 335

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
340 345 350

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
355 360 365

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
370 375 380

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
385 390 395 400

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu  
405 410 415

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
420 425 430

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
435 440 445

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
450 455 460

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
465 470 475 480

ES 2 935 062 T3

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
485 490 495

<210> 46

<211> 269

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Segunda cadena polipeptídica del DART 2 de control

10

<400> 46

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly  
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly  
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Arg Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly  
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu  
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr  
165 170 175

Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
180 185 190

ES 2 935 062 T3

Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val  
195 200 205

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp  
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys  
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
260 265

<210> 47

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido espaciador intermedio (Enlazador 4)

10 <400> 47

Ala Pro Ser Ser Ser  
1 5

15 <210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido espaciador intermedio (Enlazador 4)

<400> 48

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu  
1 5

25

## REIVINDICACIONES

1. Un diacuerpo que comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica,

5 en donde dicha primera y segunda cadenas polipeptídicas forman un complejo unido covalentemente y en donde:

(A) dicha primera cadena polipeptídica comprende un dominio VL de una primera inmunoglobulina (VL1), un dominio VH de una segunda inmunoglobulina (VH2) y un dominio promotor de heterodímeros cargado que contiene cisteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 12**; y

10 (B) dicha segunda cadena polipeptídica comprende un dominio VL de la segunda inmunoglobulina (VL2), un dominio VH de la primera inmunoglobulina (VH1) y un dominio promotor de heterodímeros cargado que contiene cisteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 13**;

15 en donde dicho dominio promotor de heterodímeros cargado que contiene cisteína de dicha primera cadena polipeptídica está separado de dicho VH2 por un enlazador polipeptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 2** y dicho dominio promotor de heterodímeros cargado que contiene cisteína de dicha segunda cadena polipeptídica está separado de dicho VH1 por un enlazador polipeptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 2**; y

20 en donde dicho dominio promotor de heterodímeros cargado que contiene cisteína de dicha primera cadena polipeptídica y dicho dominio promotor de heterodímeros cargado que contiene cisteína de dicha segunda cadena polipeptídica están unidos covalentemente entre sí a través de un enlace disulfuro entre la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 12** y la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 13**.

25 2. El diacuerpo de la reivindicación 1, que es un diacuerpo Fc biespecífico de CD19 x CD3 capaz de unirse específicamente a CD19 y a CD3, en donde el diacuerpo comprende además una tercera cadena polipeptídica, en donde dichas cadenas polipeptídicas forman dicho complejo unido covalentemente y en donde:

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

30 A. un dominio IA, que comprende

(1) un subdominio (IA1), que comprende dicho dominio VL de la primera inmunoglobulina (VL1), que es capaz de unirse a CD19 (VL<sub>CD19</sub>) o a CD3 (VL<sub>CD3</sub>); y

35 (2) un subdominio (IA2), que comprende dicho dominio VH de la segunda inmunoglobulina (VH2), que es capaz de unirse a CD19 (VH<sub>CD19</sub>) o a CD3 (VH<sub>CD3</sub>);

en donde dichos subdominios IA1 e IA2 están separados entre sí por un enlazador polipeptídico y son

- (a) VL<sub>CD19</sub> y VH<sub>CD3</sub>; o
- (b) VL<sub>CD3</sub> y VH<sub>CD19</sub>;

40 B. un dominio IB, que comprende dicho dominio promotor de heterodímeros cargado que contiene cisteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 12**, en donde dicho dominio IB está separado de dicho dominio IA por dicho enlazador polipeptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 2**;

45 C. un dominio IC, que comprende un dominio CH2-CH3 de un anticuerpo, en donde dicho dominio IC está separado de dicho dominio IB por un enlazador polipeptídico; y

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

50 A. un dominio IIA, que comprende

(1) un subdominio (IIA1), que comprende dicho dominio VL de la segunda inmunoglobulina (VL2), que es capaz de unirse a CD19 (VL<sub>CD19</sub>) o a CD3 (VL<sub>CD3</sub>); y

55 (2) un subdominio (IIA2), que comprende dicho dominio VH de la primera inmunoglobulina (VH1), que es capaz de unirse a CD19 (VH<sub>CD19</sub>) o a CD3 (VH<sub>CD3</sub>);

en donde dichos subdominios IIA1 y IIA2 están separados entre sí por un enlazador polipeptídico y son:

- (a) VL<sub>CD19</sub> y VH<sub>CD3</sub>, si dichos subdominios IA1 e IA2 son VL<sub>CD3</sub> y VH<sub>CD19</sub>; o
- (b) VL<sub>CD3</sub> y VH<sub>CD19</sub>, si dichos subdominios IA1 e IA2 son VL<sub>CD19</sub> y VH<sub>CD3</sub>;

60 B. un dominio IIB, que comprende dicho dominio promotor de heterodímeros cargado que contiene cisteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 13**, en donde dicho dominio IIB está separado de dicho dominio IIA por dicho enlazador polipeptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 2** y en donde dicho dominio promotor de heterodímeros cargado de dicho dominio IB y dicho dominio promotor de heterodímeros cargado de dicho dominio IIB tienen cargas opuestas; y

III. dicha tercera cadena polipeptídica comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un enlazador polipeptídico y un domino IIIC que comprende un domino CH2-CH3 de un anticuerpo, en donde dicho enlazador polipeptídico de dicha tercera cadena polipeptídica y dicho enlazador polipeptídico de dicha primera cadena polipeptídica que separa dicho domino IC y dicho domino IB están unidos covalentemente entre sí a través de un enlace disulfuro y en donde:

- 5 (1) dicho enlazador polipeptídico de dicha tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 4** y dicho enlazador polipeptídico de dicha primera cadena polipeptídica que separa dicho domino IC y dicho domino IB comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 4**; o  
 10 (2) dicho enlazador polipeptídico de dicha tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 5** y dicho enlazador polipeptídico de dicha primera cadena polipeptídica que separa dicho domino IC y dicho domino IB comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 5**; y

15 en donde:

- 15 (1) dicho VL<sub>CD19</sub> comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 17** y dicho VH<sub>CD19</sub> comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 21**; y  
 20 (2) dicho VL<sub>CD3</sub> comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 25** y dicho VH<sub>CD3</sub> comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 29**; y  
 25 (3) dichos dominios VL<sub>CD19</sub> y VH<sub>CD19</sub> forman un dominio de unión a CD19 monovalente; y  
 (4) dichos dominios VL<sub>CD3</sub> y VH<sub>CD3</sub> forman un dominio de unión a CD3 monovalente; y  
 (5) dichos dominios CH2-CH3 de dichas primera y tercera cadenas polipeptídicas forman un dominio Fc capaz de unirse a un receptor Fc, formando así dicho diacuerpo Fc biespecífico de CD19 x CD3.

25 3. El diacuerpo de la reivindicación 2, donde dicho domino CH2-CH3 de dicho domino IC comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 15** y dicho domino CH2-CH3 de dicho domino IIIC comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 16**.

30 4. El diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en donde:

- 30 (A) dicha primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 35**;  
 (B) dicha segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 37**; y  
 (C) dicha tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 39**.

35 5. Una composición farmacéutica que comprende el diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4 o la composición farmacéutica de la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con o **caracterizada por** la expresión de CD19, en donde dicha enfermedad o afección asociada con o **caracterizada por** la expresión de CD19 es cáncer.

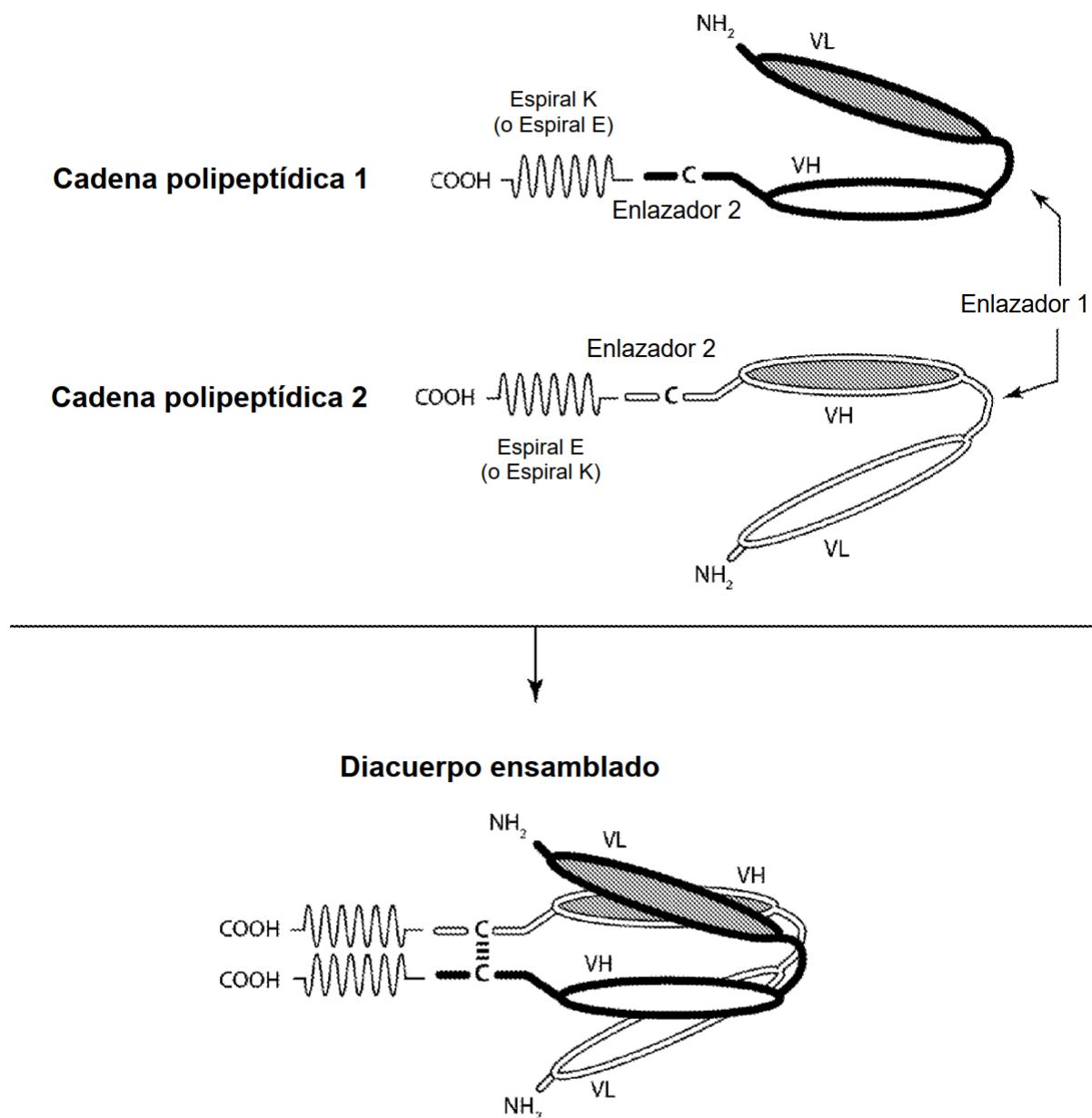
45 7. El diacuerpo o la composición farmacéutica, para el uso de la reivindicación 6, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), crisis blástica de CML, Oncogén Abelson asociado con LMC (translocación Bcr-ABL), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia linfoblástica aguda de precursores de linfocitos B (B-ALL, por sus siglas en inglés), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica (LLC), síndrome de Richter, transformación de Richter de LLC, tricoleucemia (HCL), neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas (BPDCN), linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia de células de manto (MCL), linfoma linfocítico pequeño (LLP), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica y linfoma de Burkitt.

50 8. Una composición farmacéutica que comprende el diacuerpo de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 9. Un polinucleótido que codifica polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 35**, la **SEQ ID NO: 37** y la **SEQ ID NO: 39**.

10. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 9.

60 11. El polinucleótido de la reivindicación 9, que comprende las secuencias de la **SEQ ID NO: 36**, la **SEQ ID NO: 38** y la **SEQ ID NO: 40**.

**Figura 1**

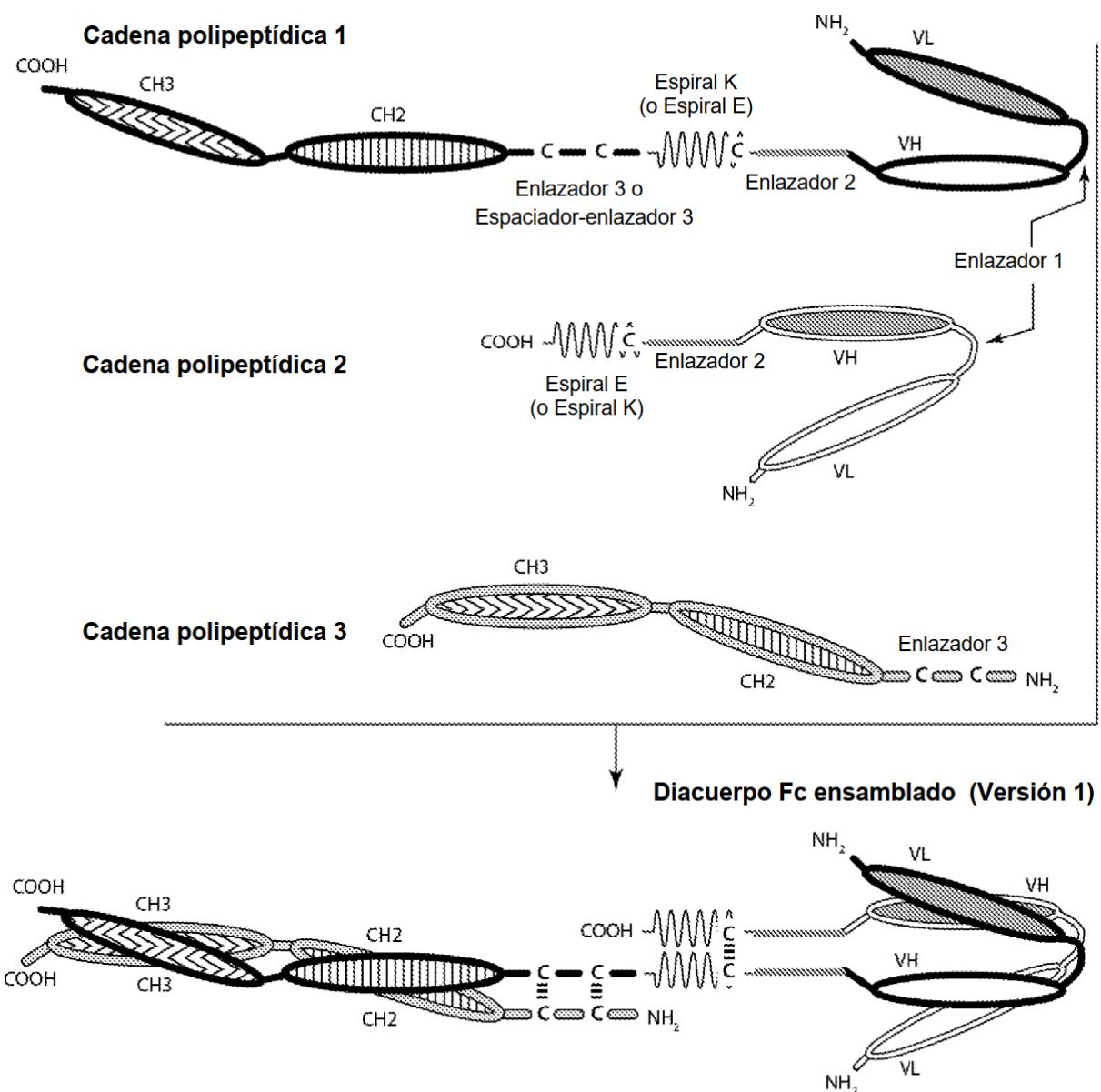
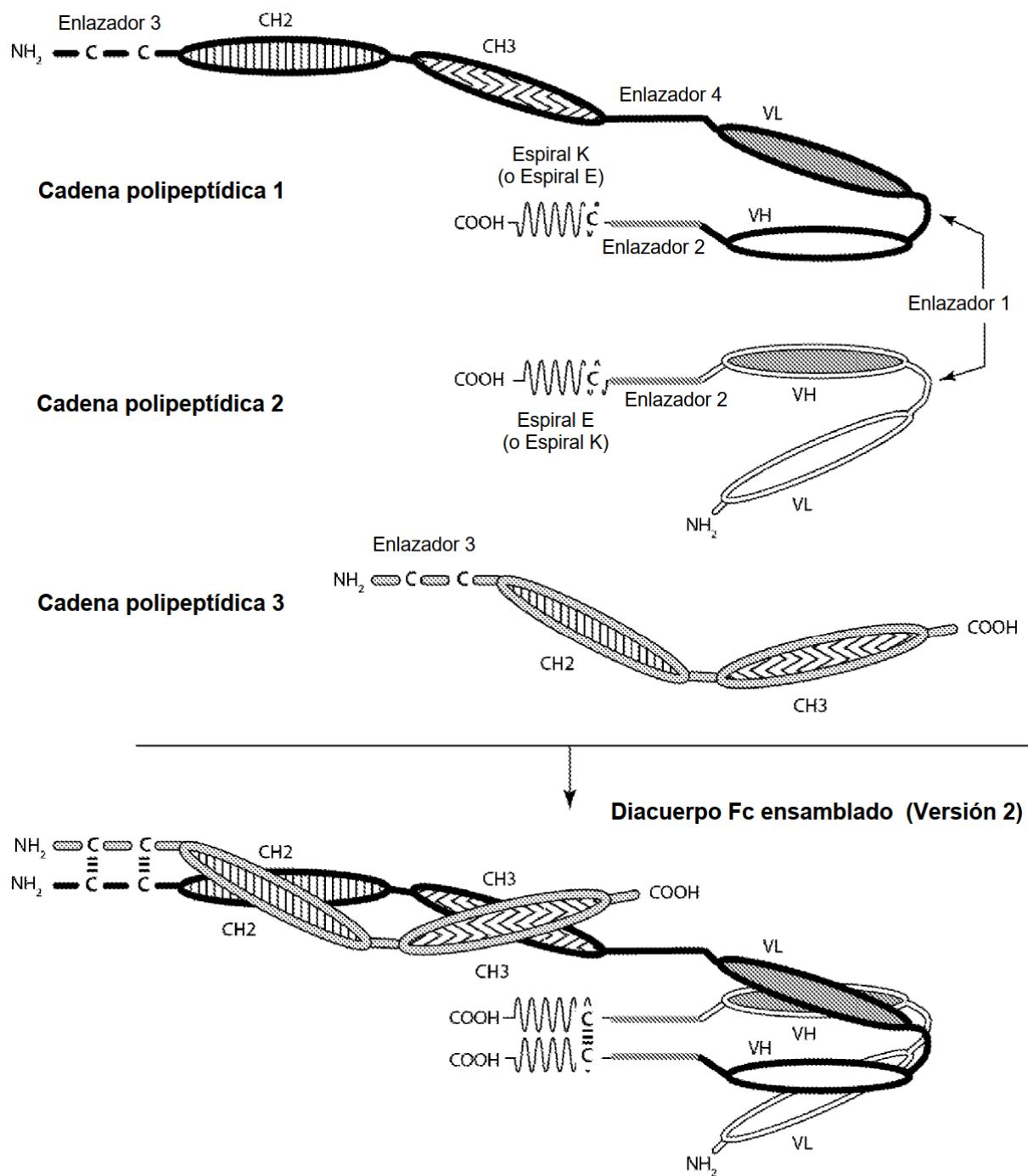


Figura 2A

**Figura 2B**

## ELISA biespecífico

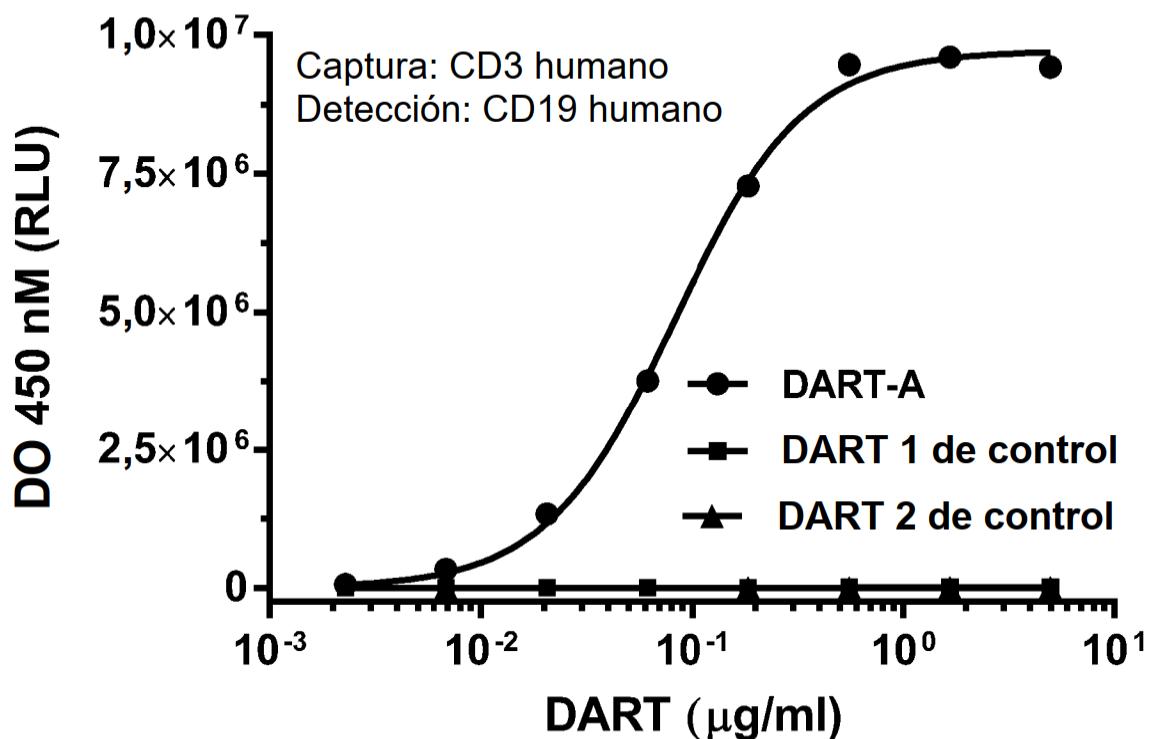
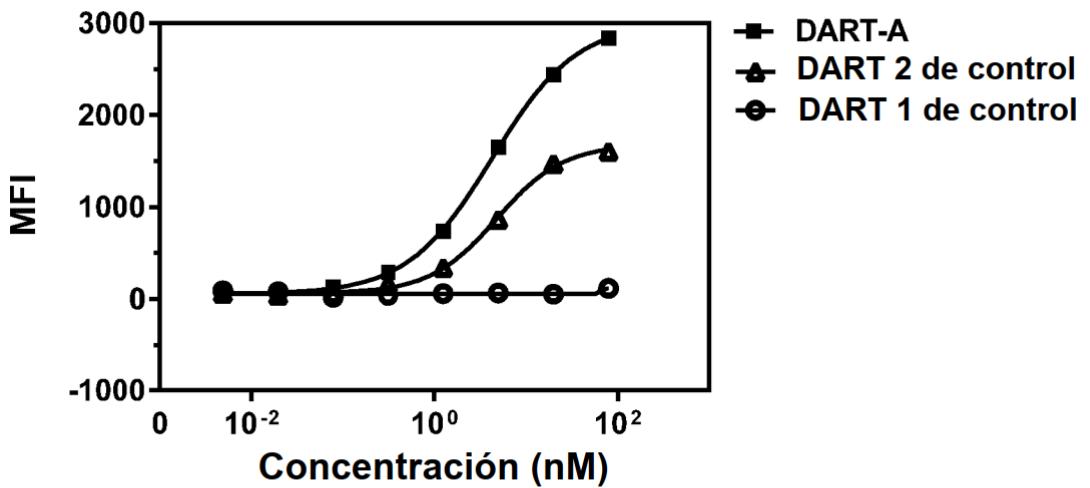


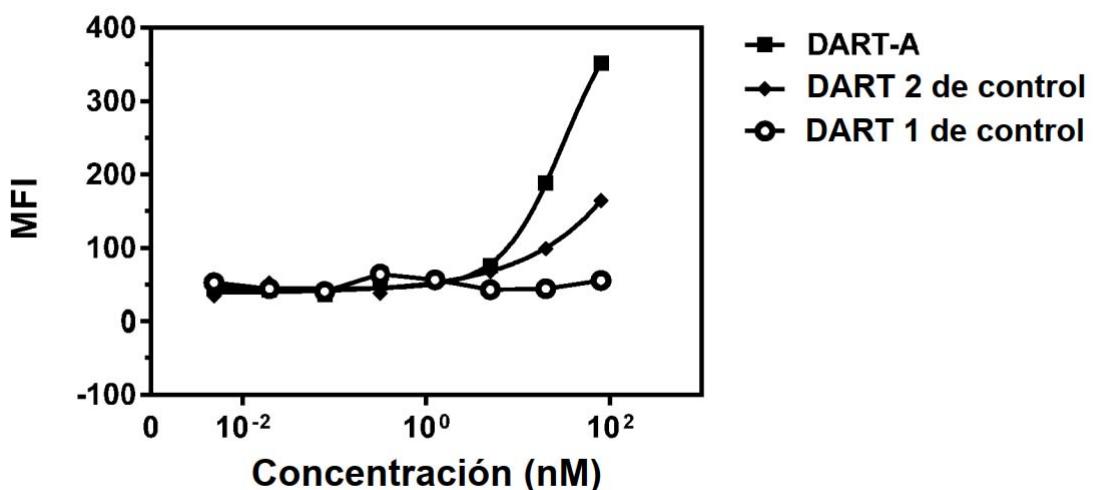
Figura 3

**Ventana de análisis de unión de CD20+ a leucocitos humanos**



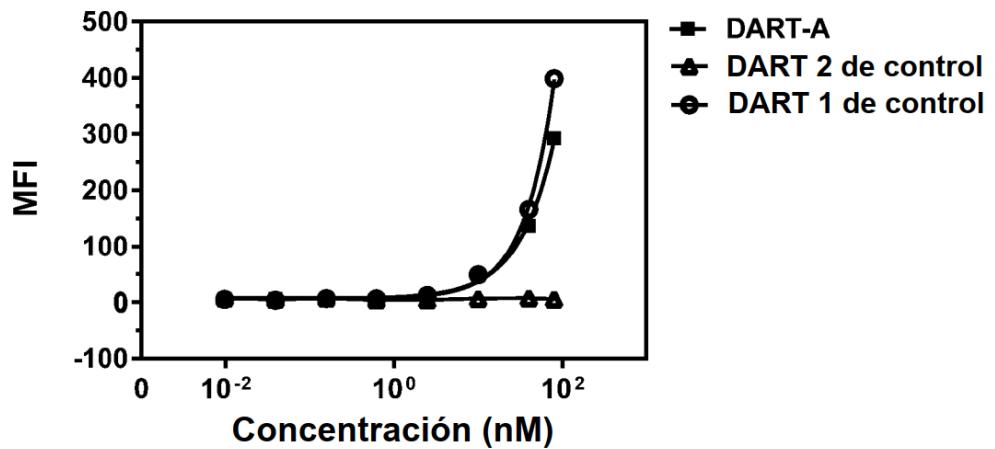
**Figura 4A**

**Uniones de CD20+ a leucocitos de cinomolgo seleccionadas**



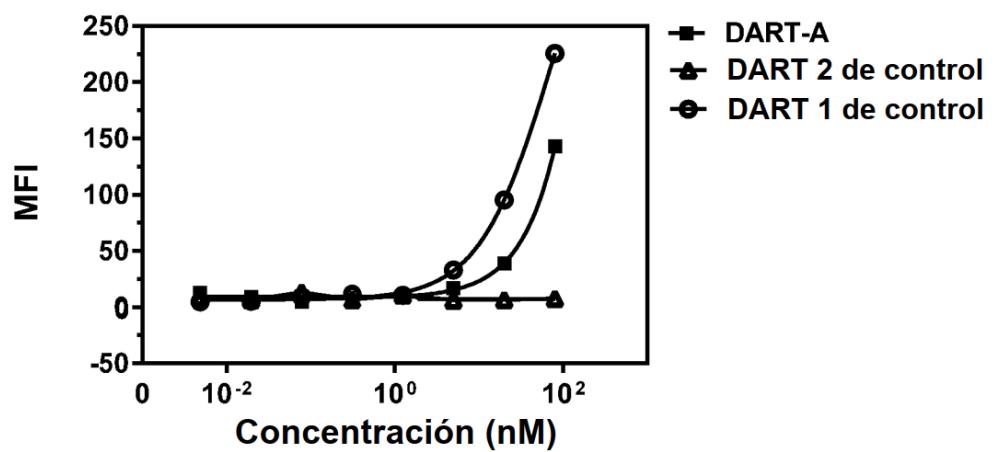
**Figura 4B**

**Ventana de análisis de unión de CD4+CD8+ a leucocitos humanos**



**Figura 5A**

**Ventana de análisis de unión de CD4+CD8+ a leucocitos de cinomolgo**



**Figura 5B**

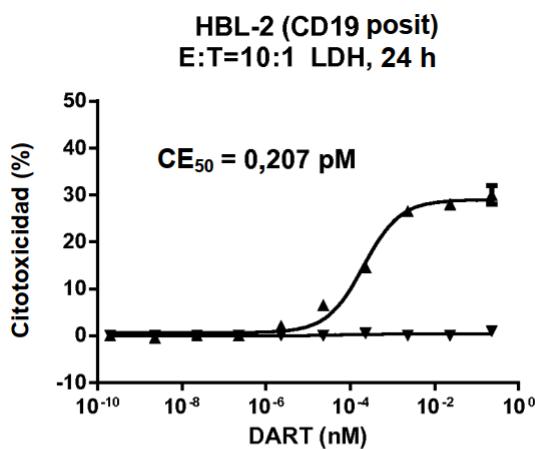


Figura 6A

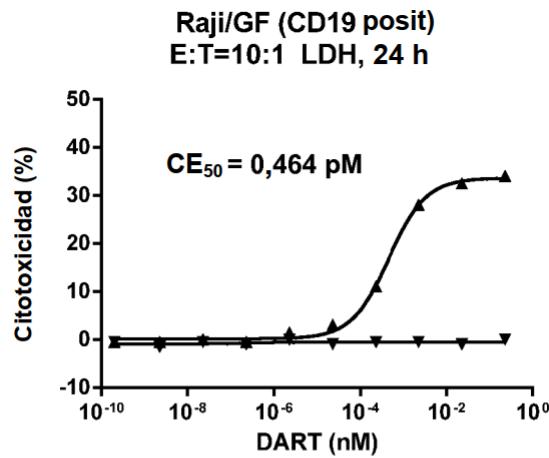


Figura 6B

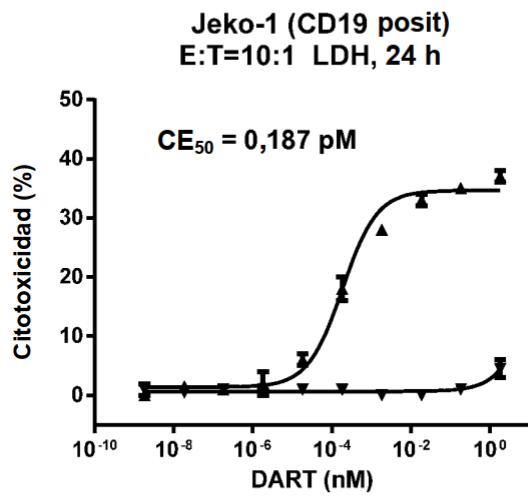


Figura 6C

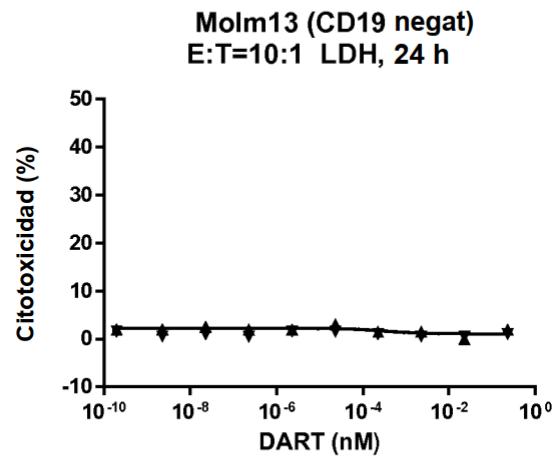


Figura 6D

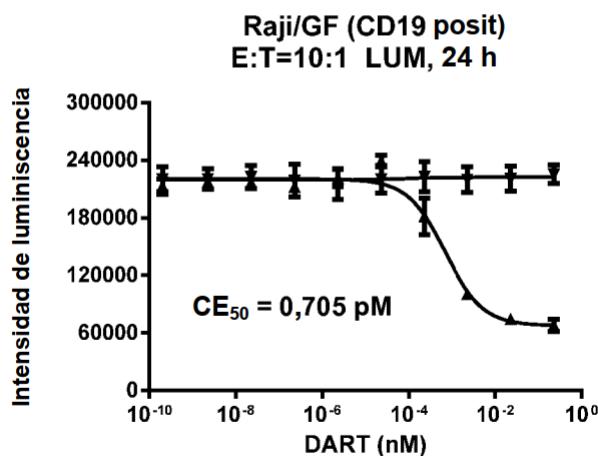


Figura 6E

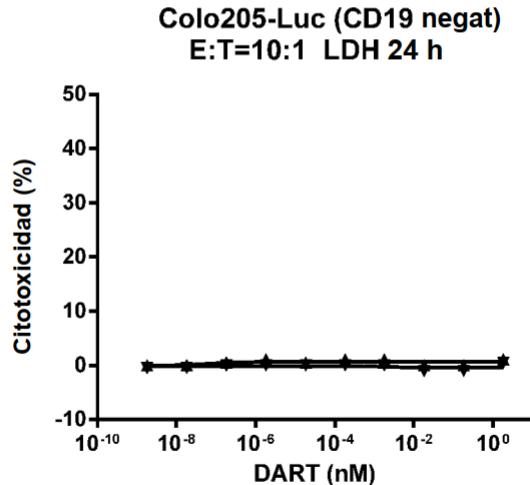


Figura 6F

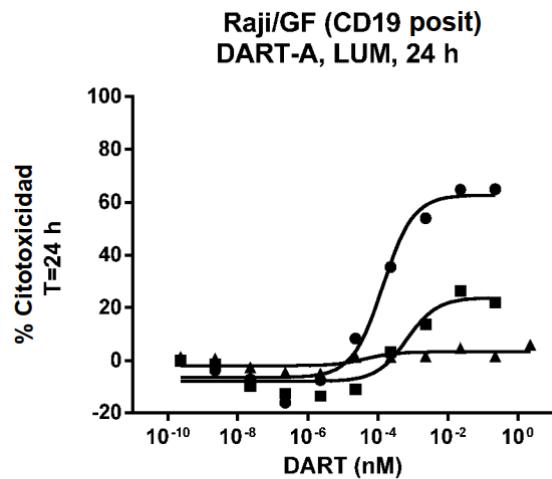


Figura 7A

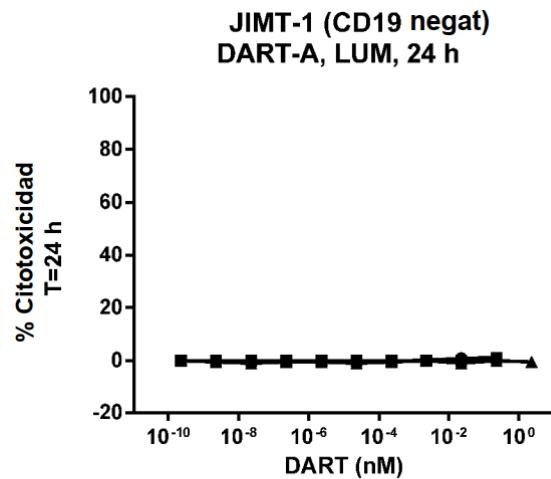


Figura 7C

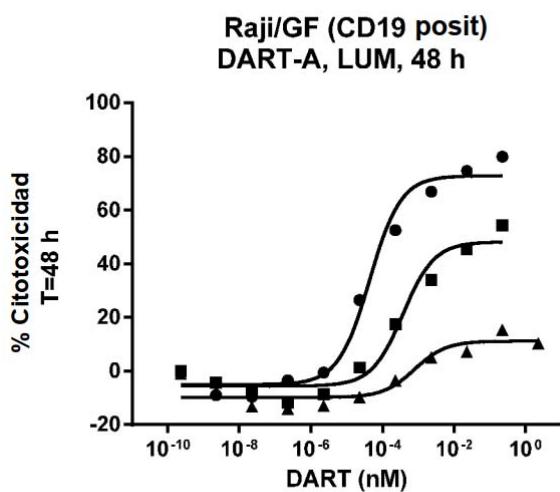


Figura 7B

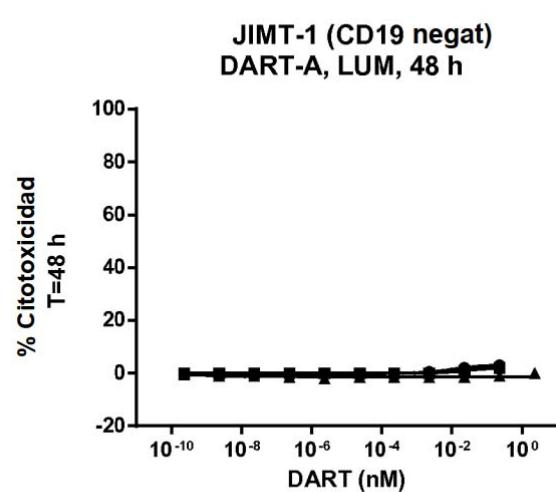


Figura 7D

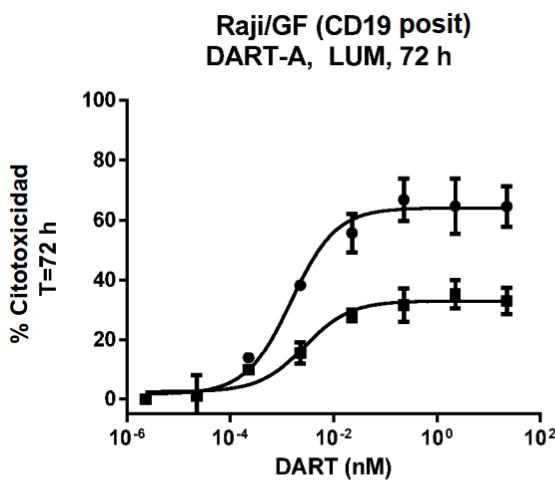


Figura 8A

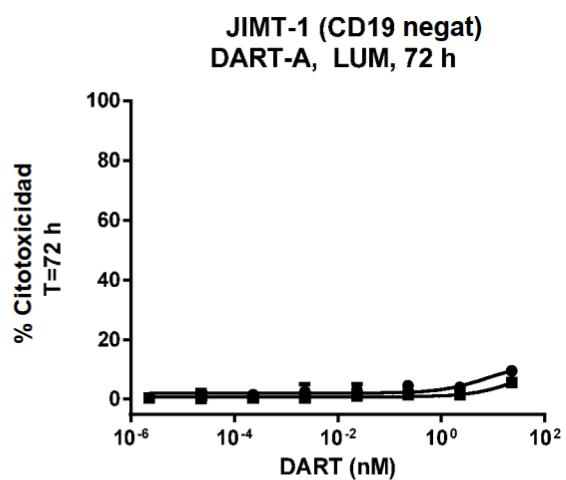


Figura 8C

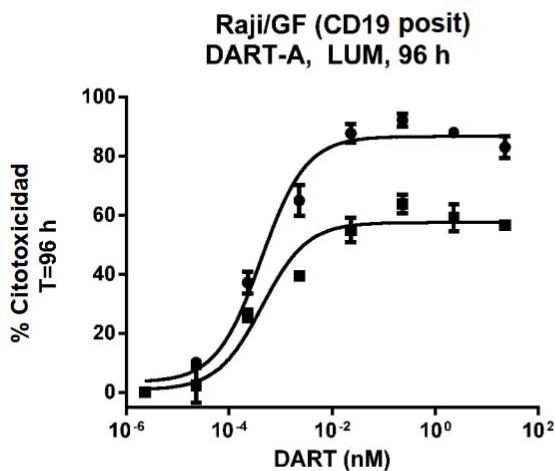


Figura 8B

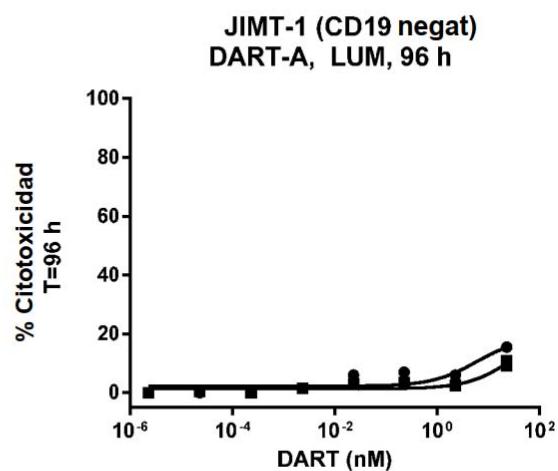
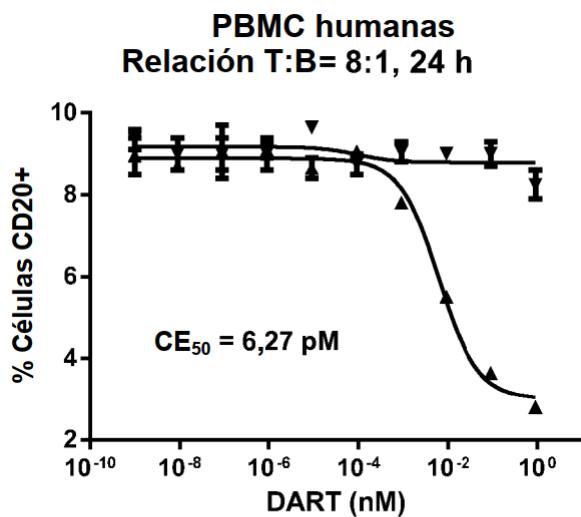
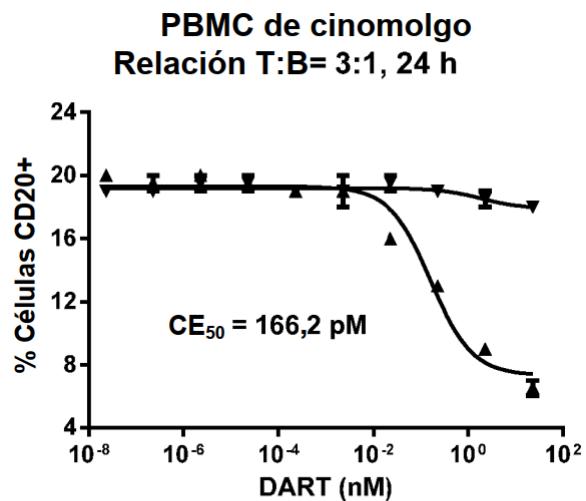


Figura 8D

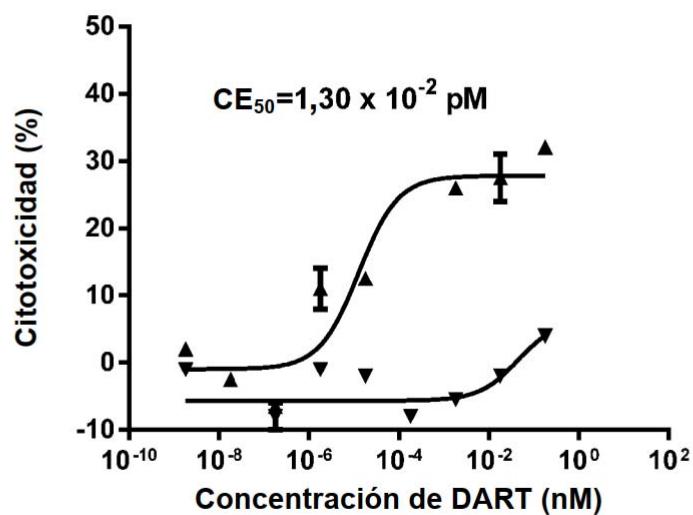


**Figura 9A**

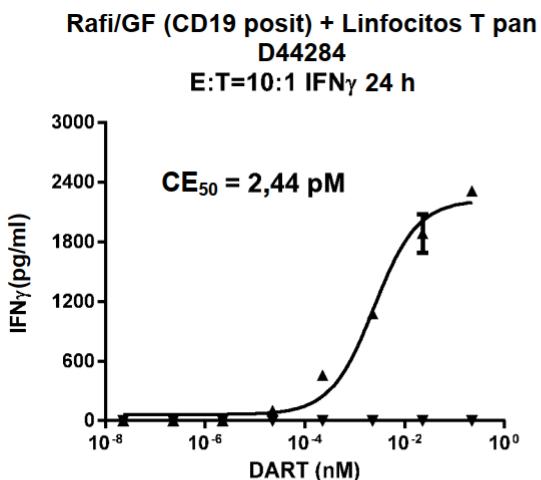


**Figura 9B**

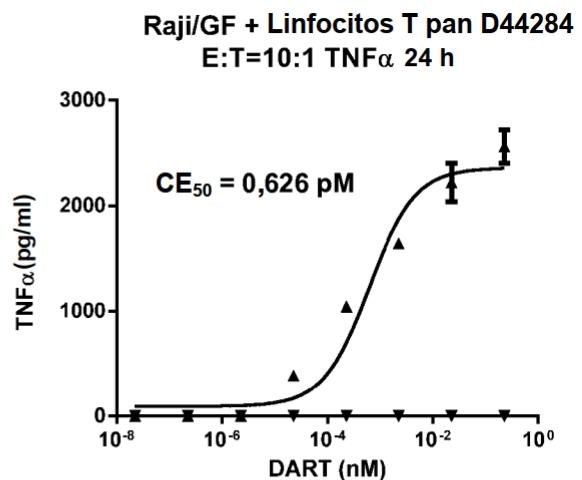
**Raji/GF (CD19 posit) + PBMC de cinomolgo C20142**  
E:T=30:1 LDH, 24 h



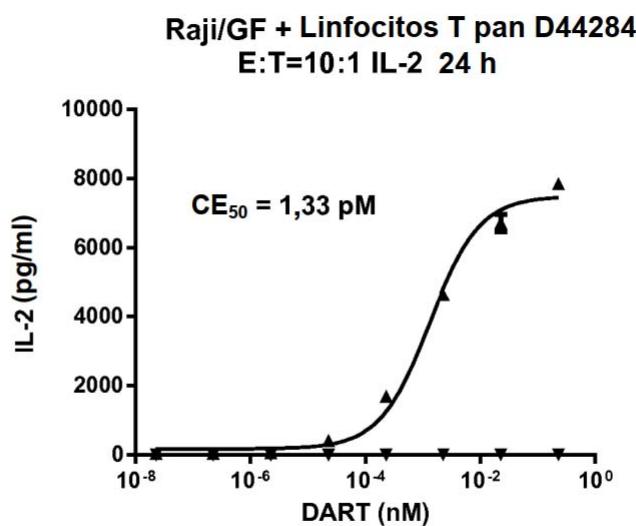
**Figura 10**



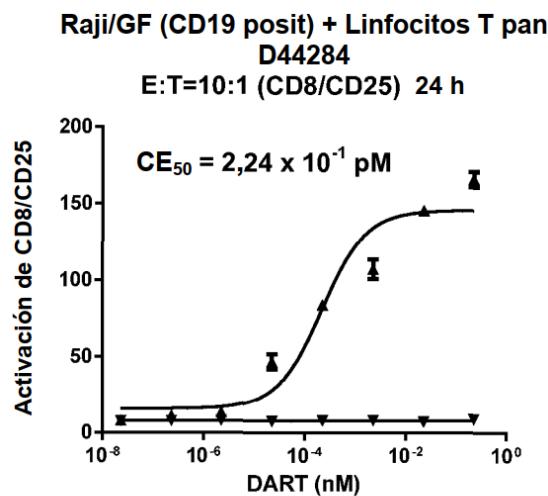
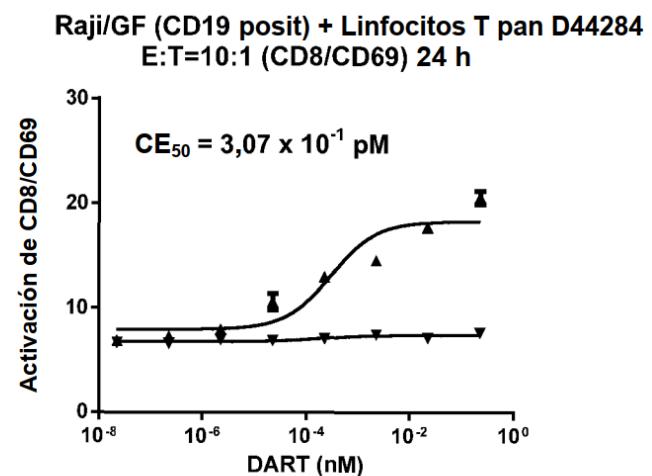
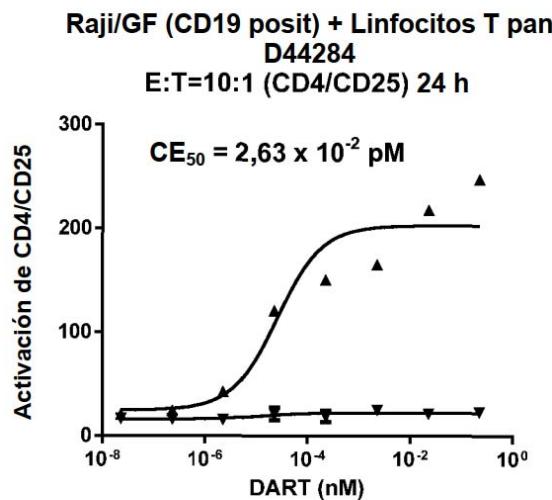
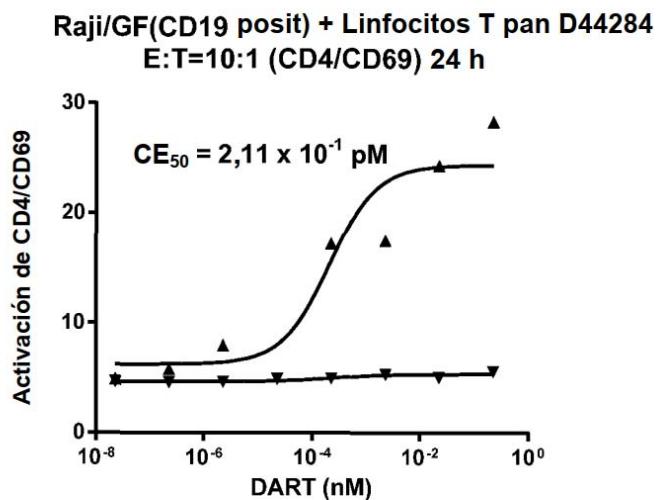
**Figura 11A**

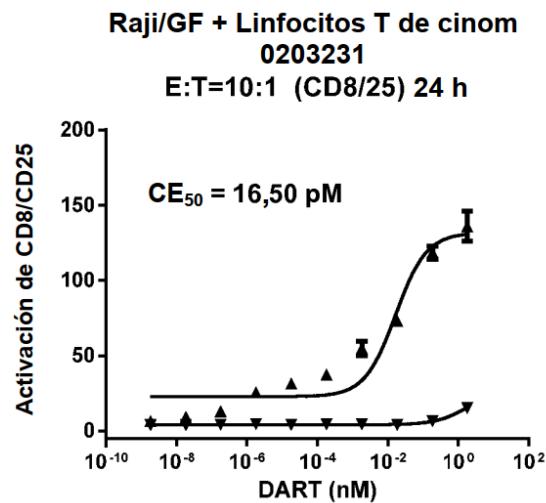
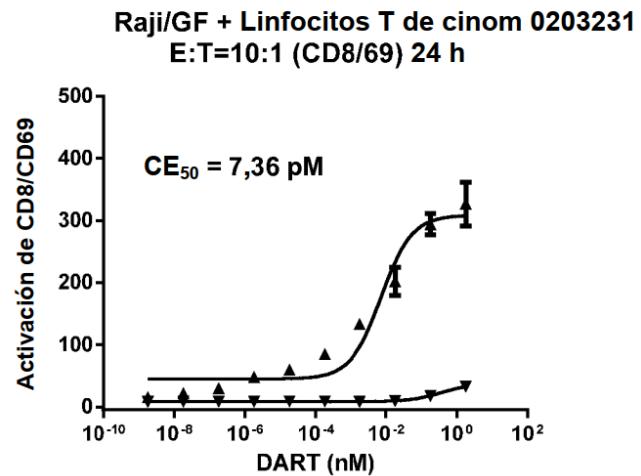
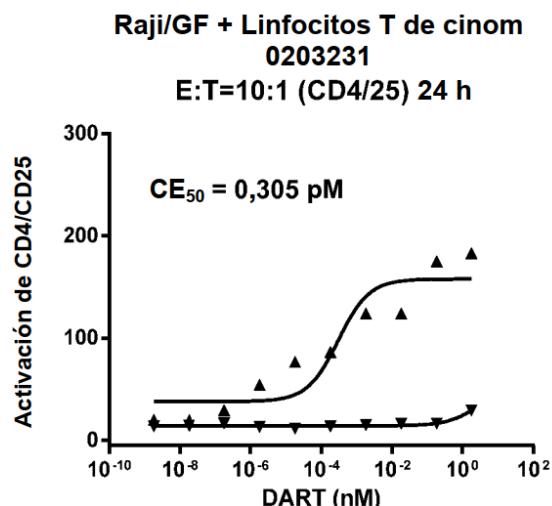
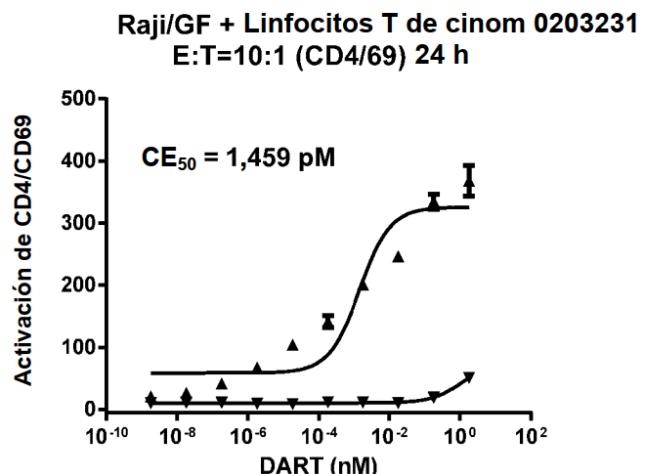


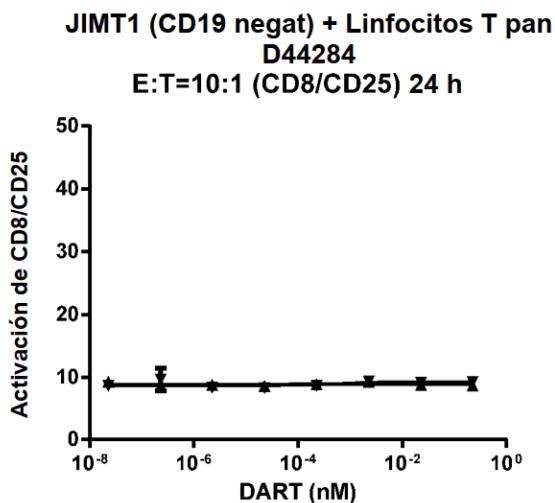
**Figura 11B**



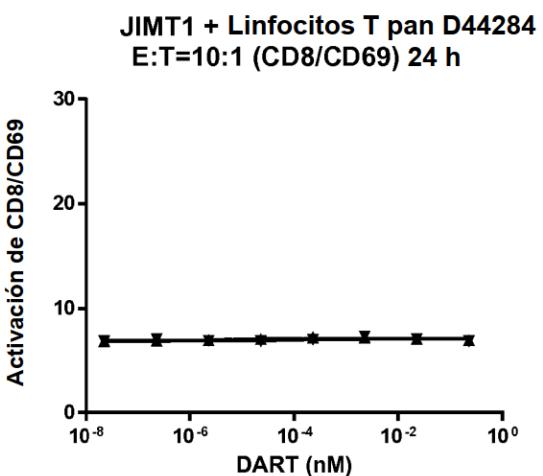
**Figura 11C**

**Figura 12A****Figura 12C****Figura 12B****Figura 12D**

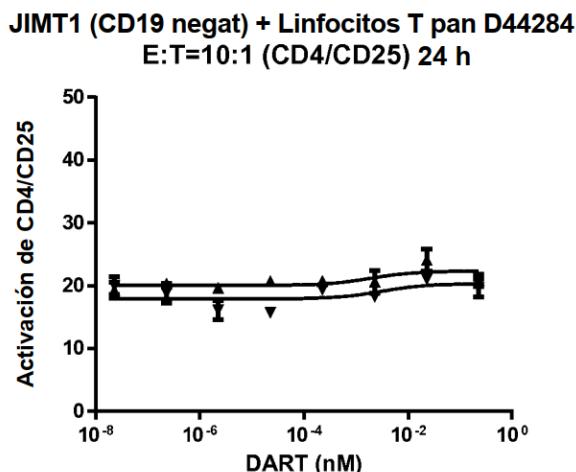
**Figura 13A****Figura 13C****Figura 13B****Figura 13D**



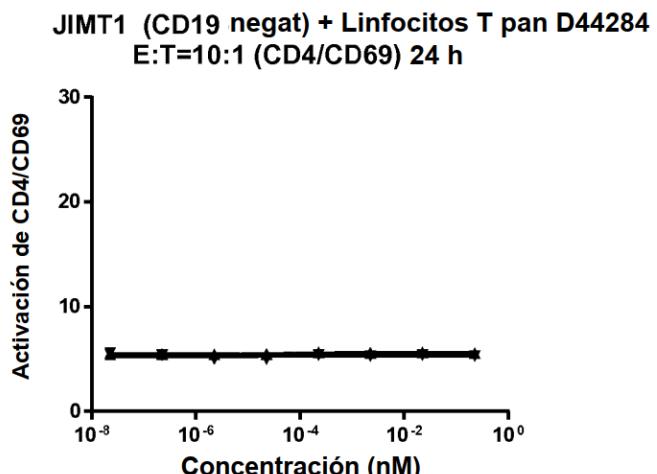
**Figura 14A**



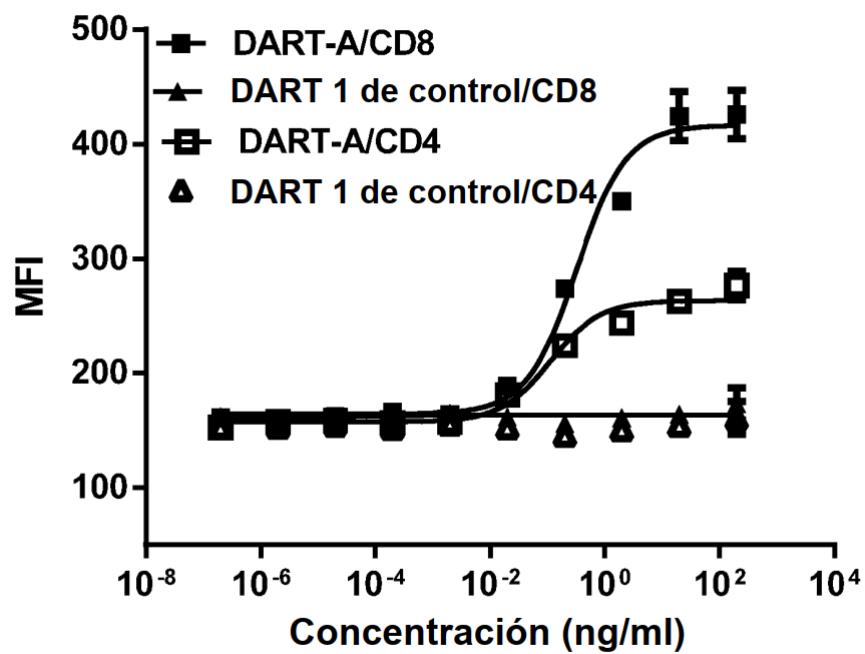
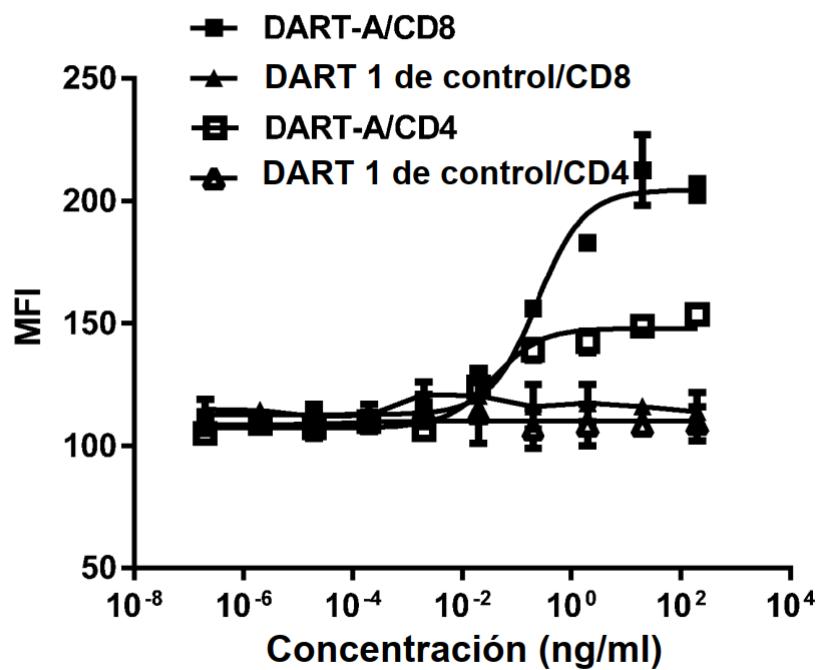
**Figura 14C**

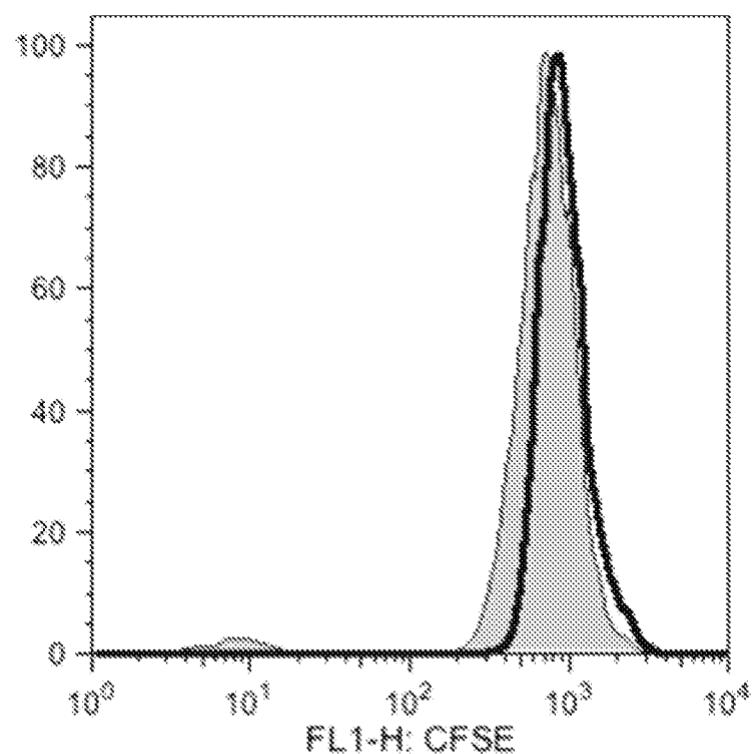


**Figura 14B**

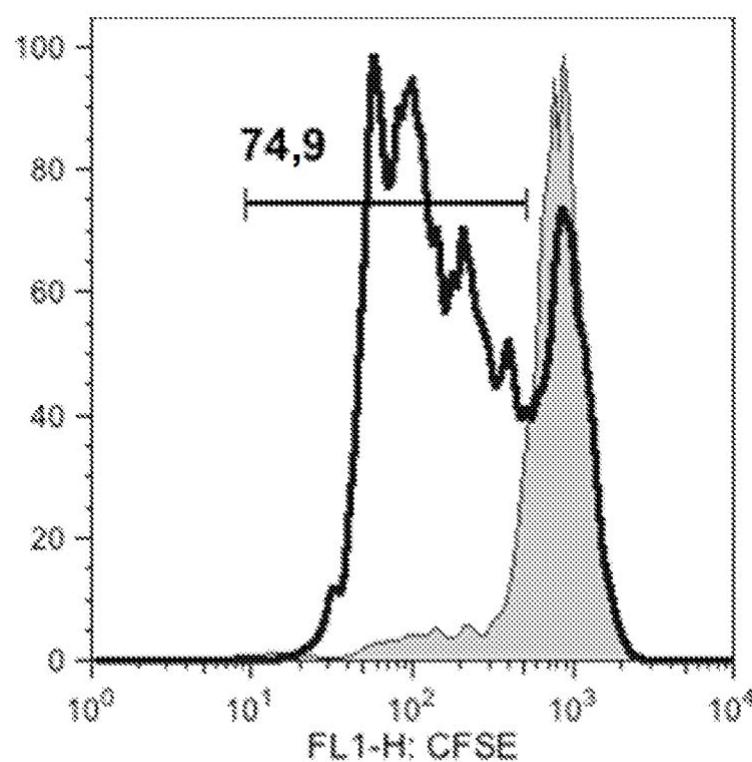


**Figura 14D**

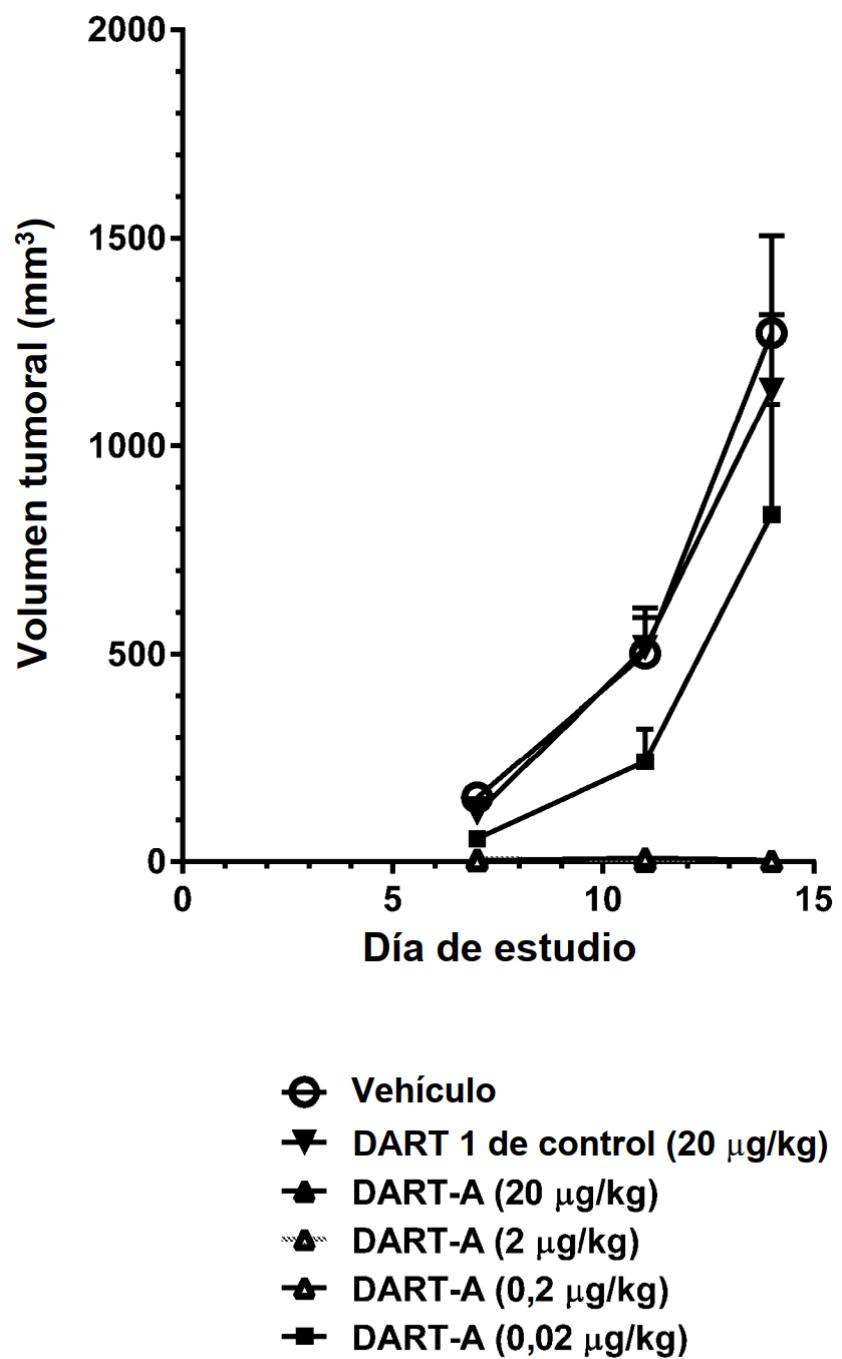
**Granzima B****Figura 15A****Perforina****Figura 15B**

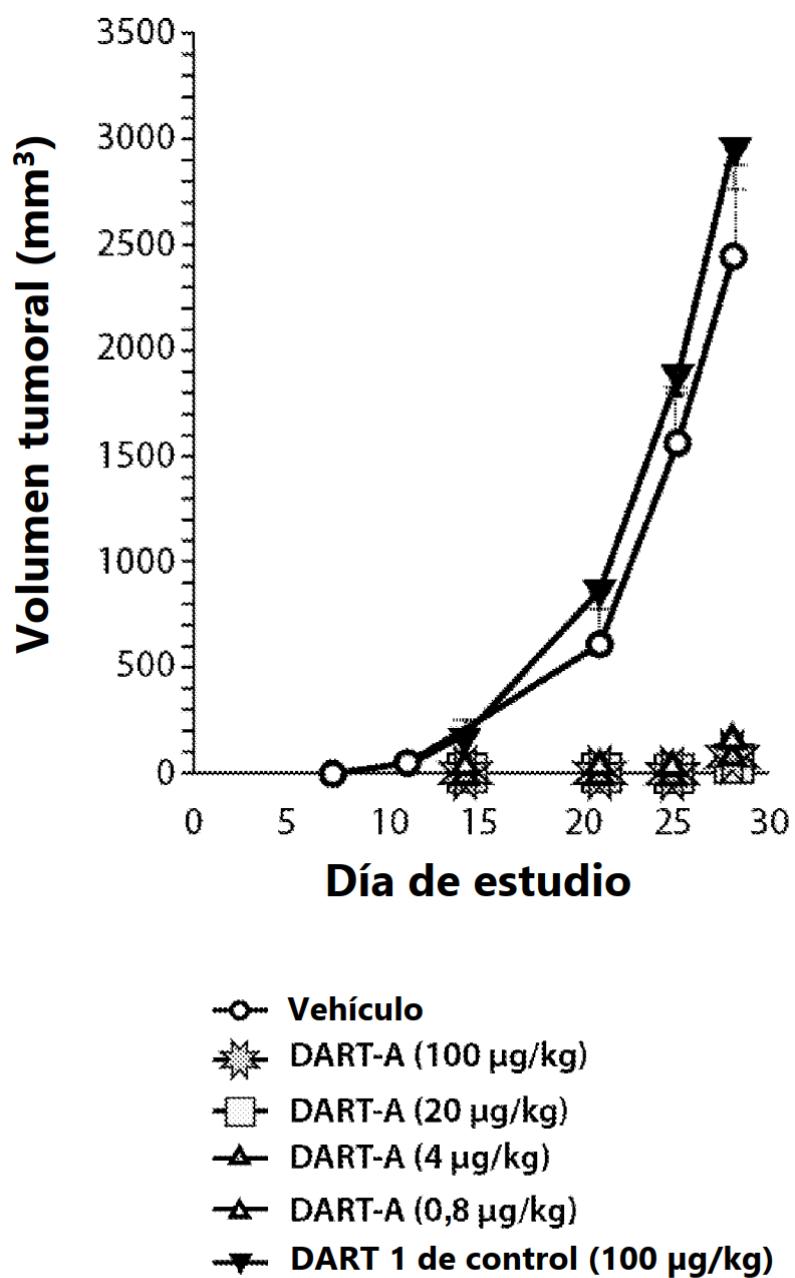


**Figura 16A**



**Figura 16B**





**Figura 18**

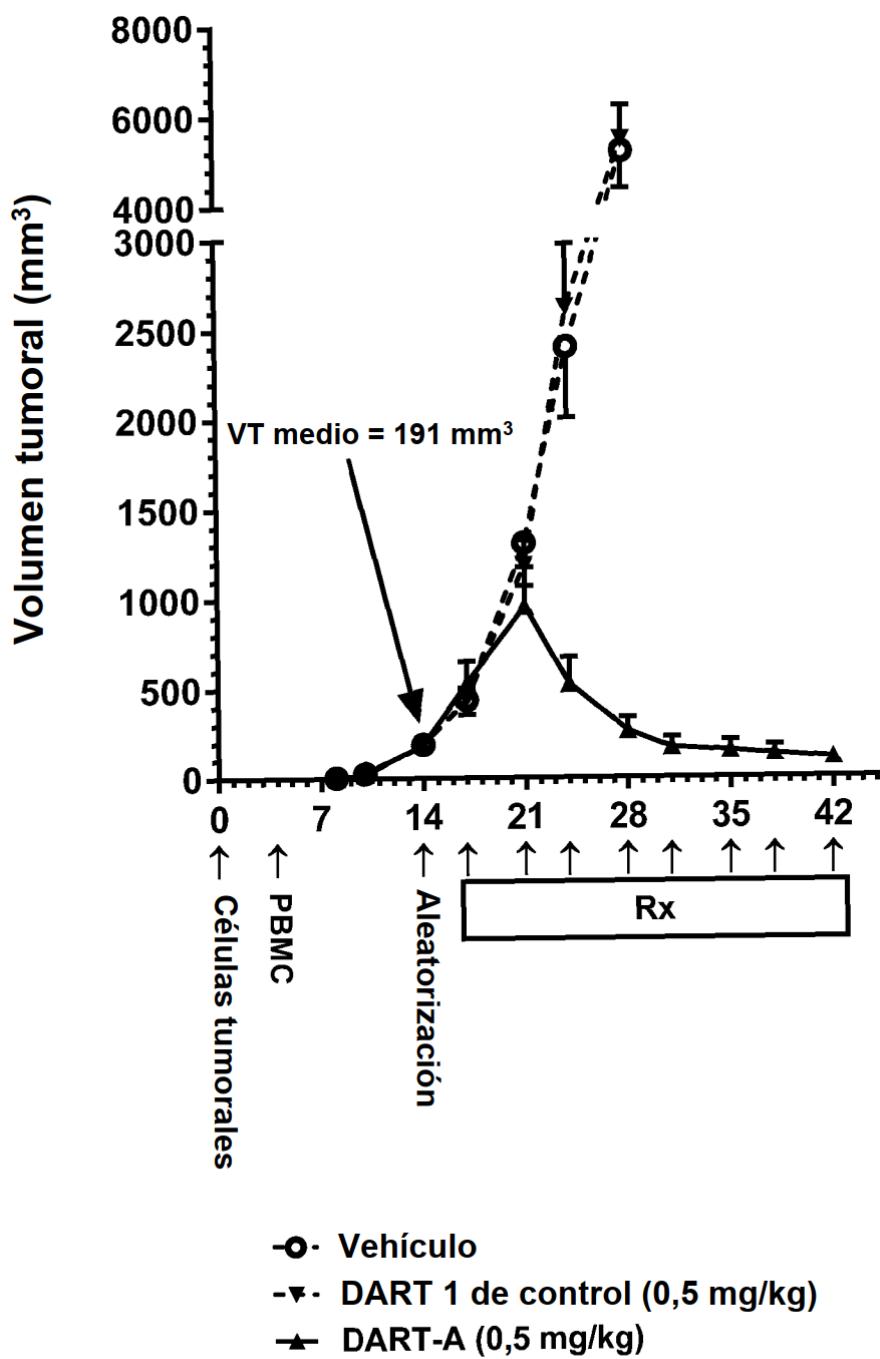
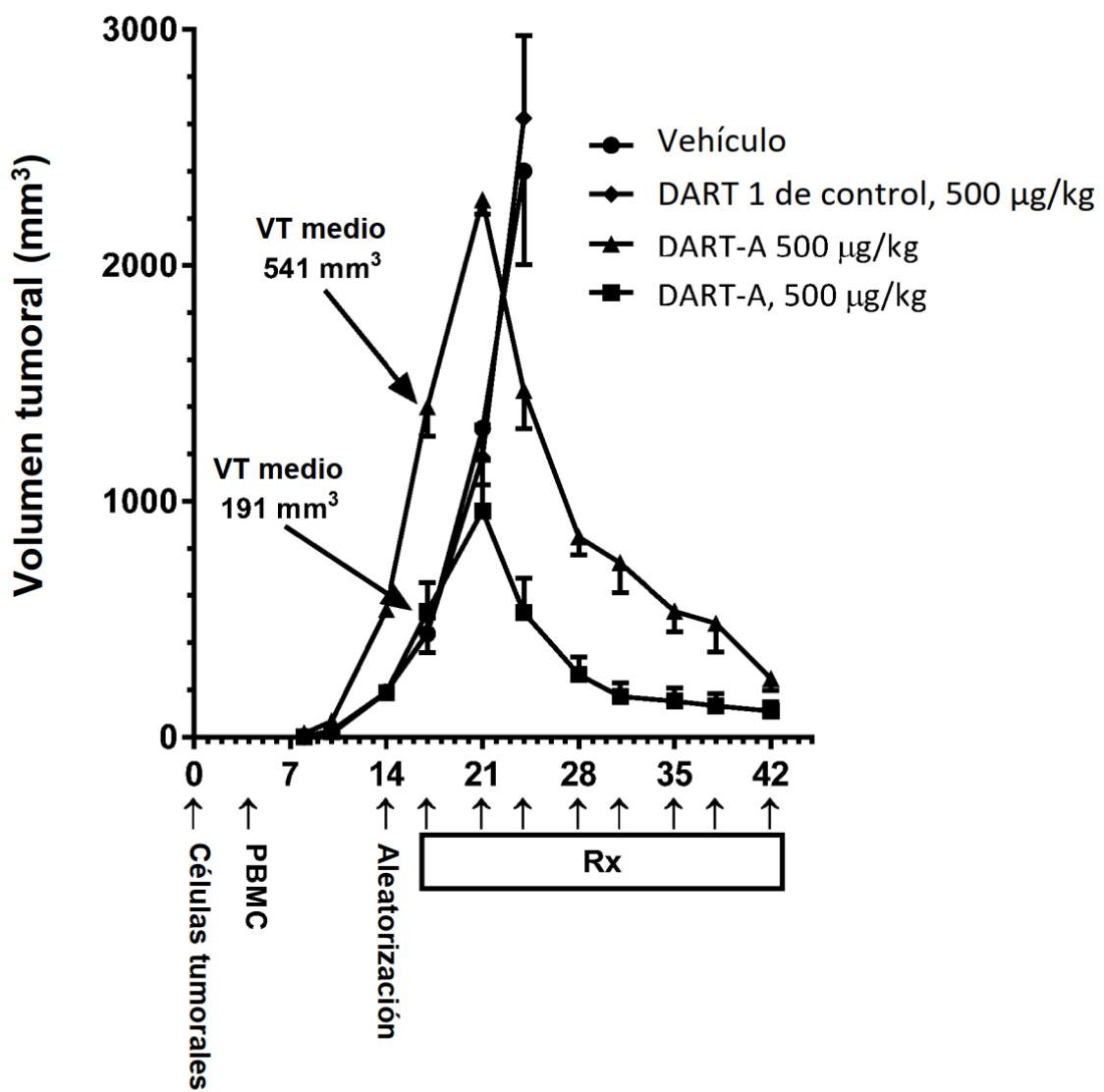
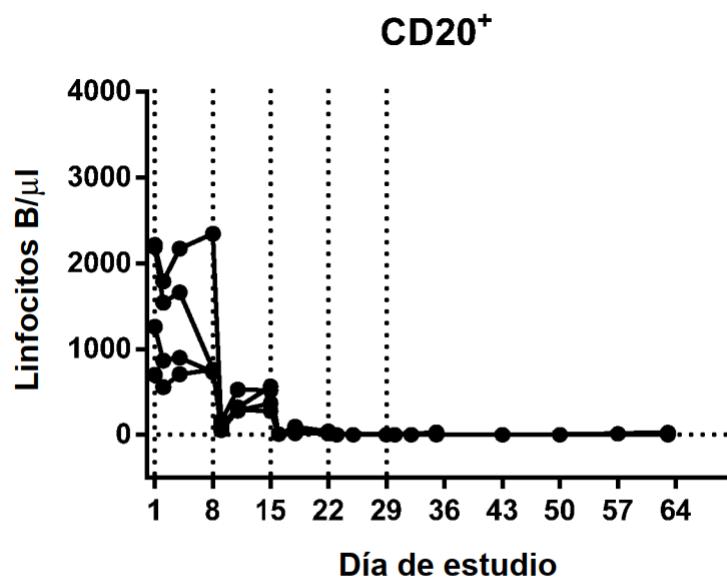
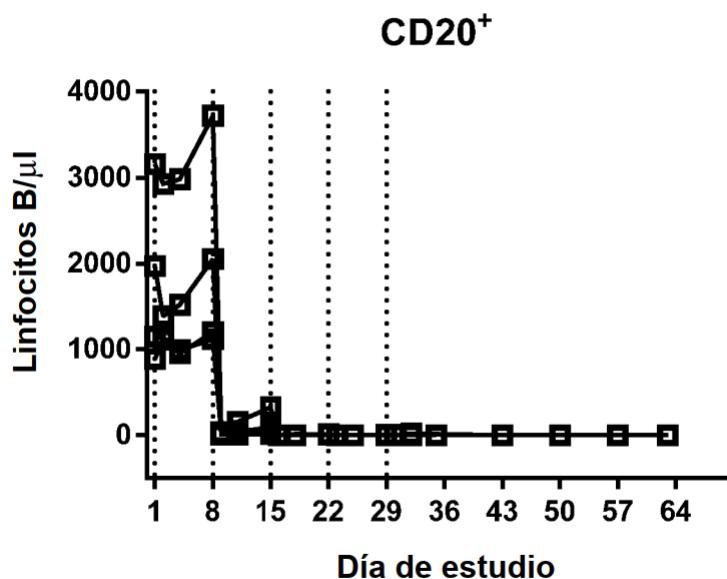


Figura 19A

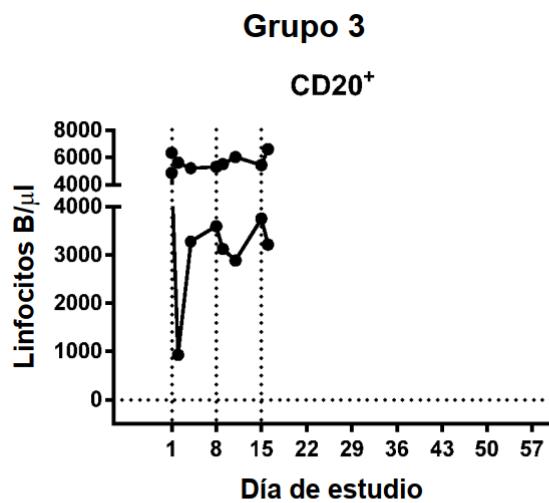




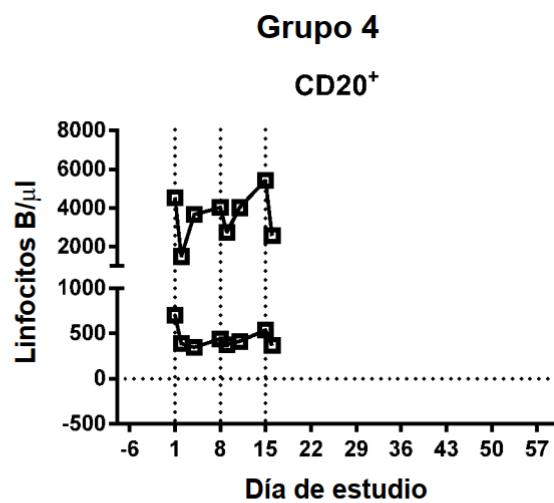
**Figura 20A**



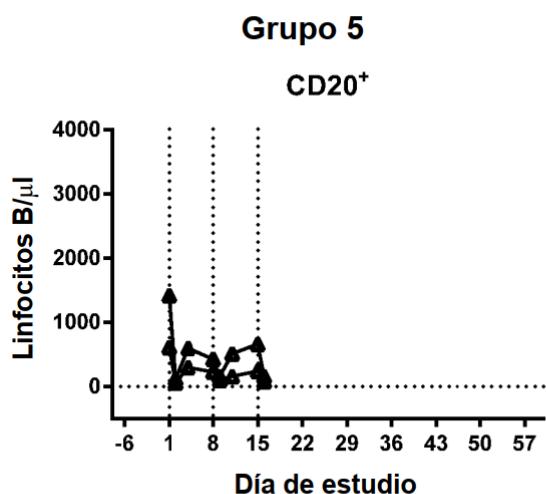
**Figura 20B**



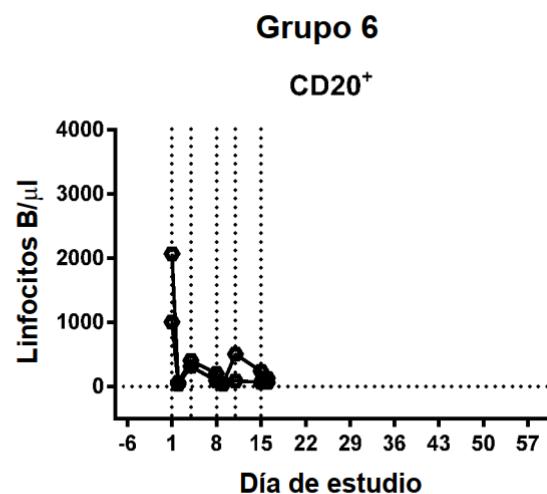
**Figura 21A**



**Figura 21B**



**Figura 21C**



**Figura 21D**

## Análisis de PK de FcRn humano de ratones transgénicos

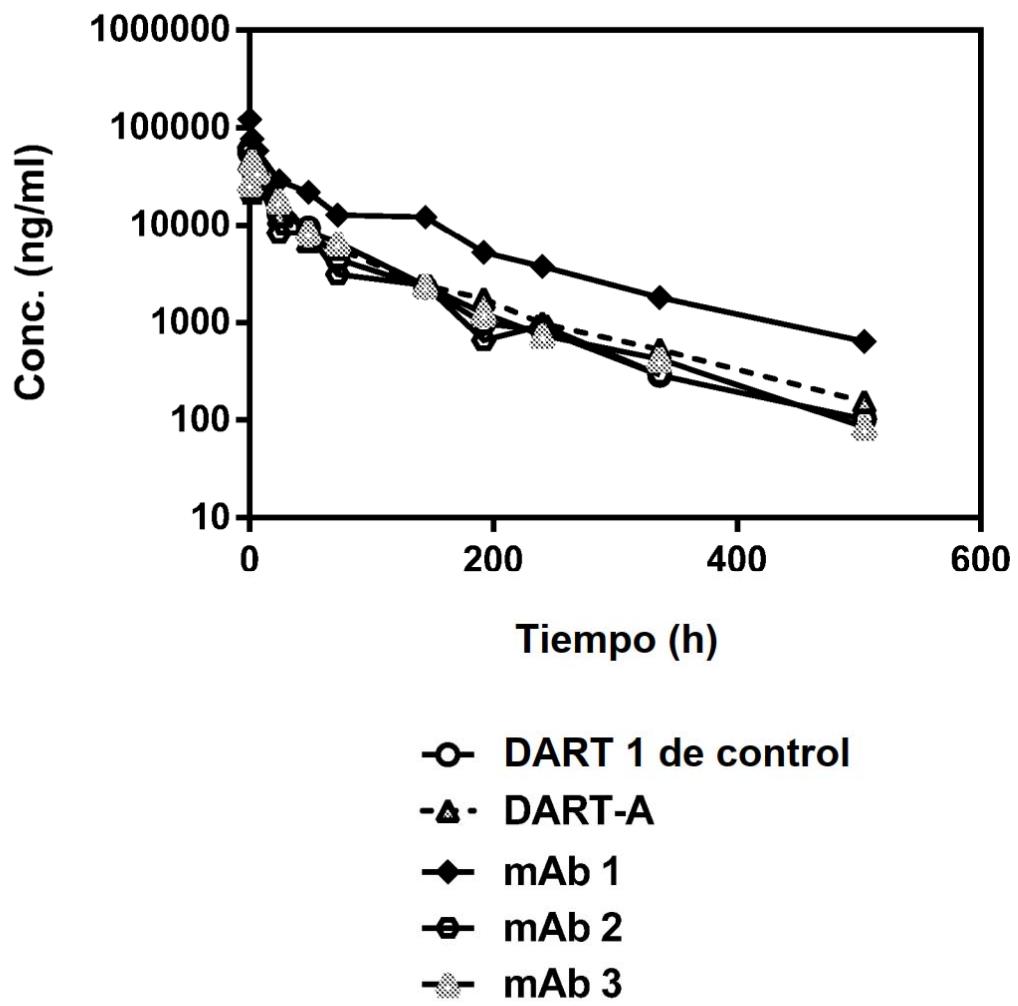
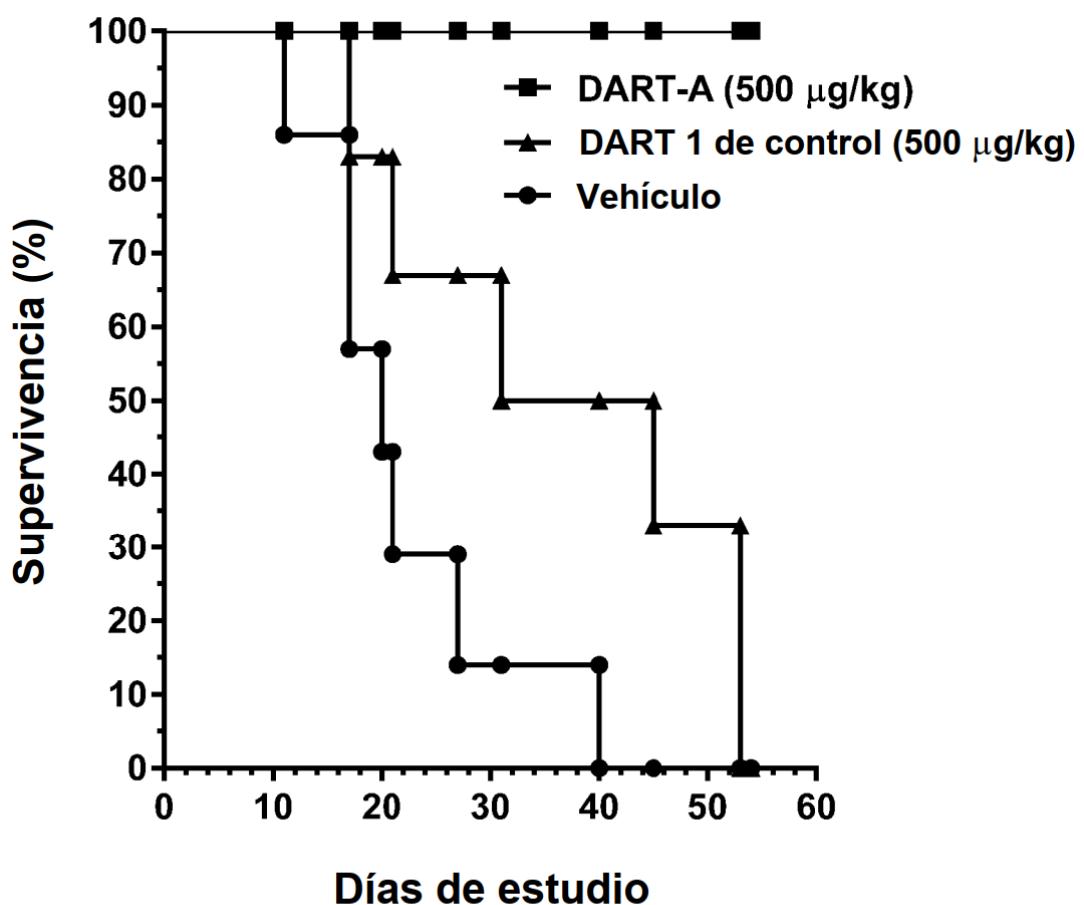


Figura 22



**Figura 23**

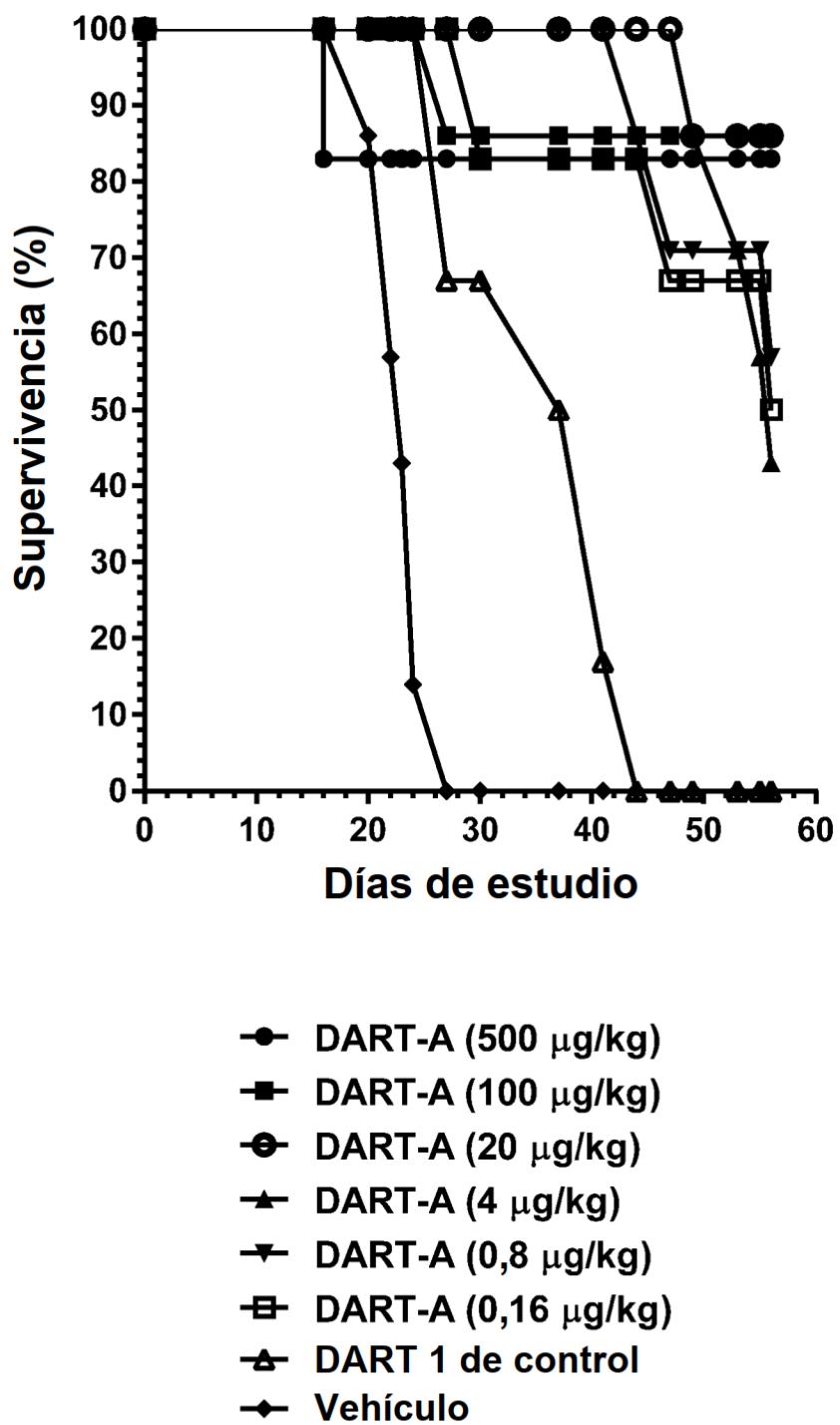
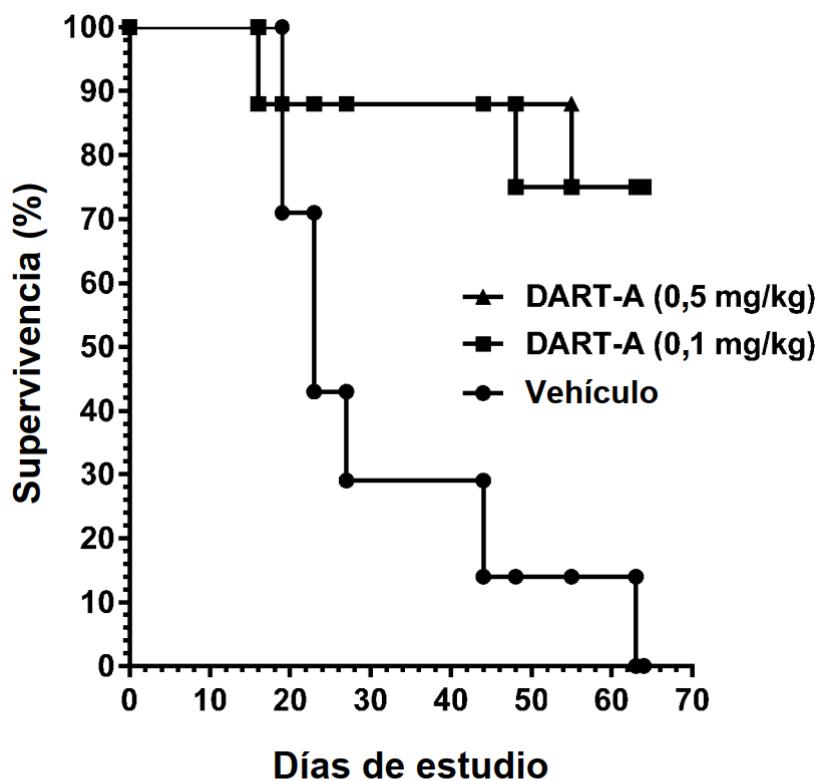


Figura 24



**Figura 25**

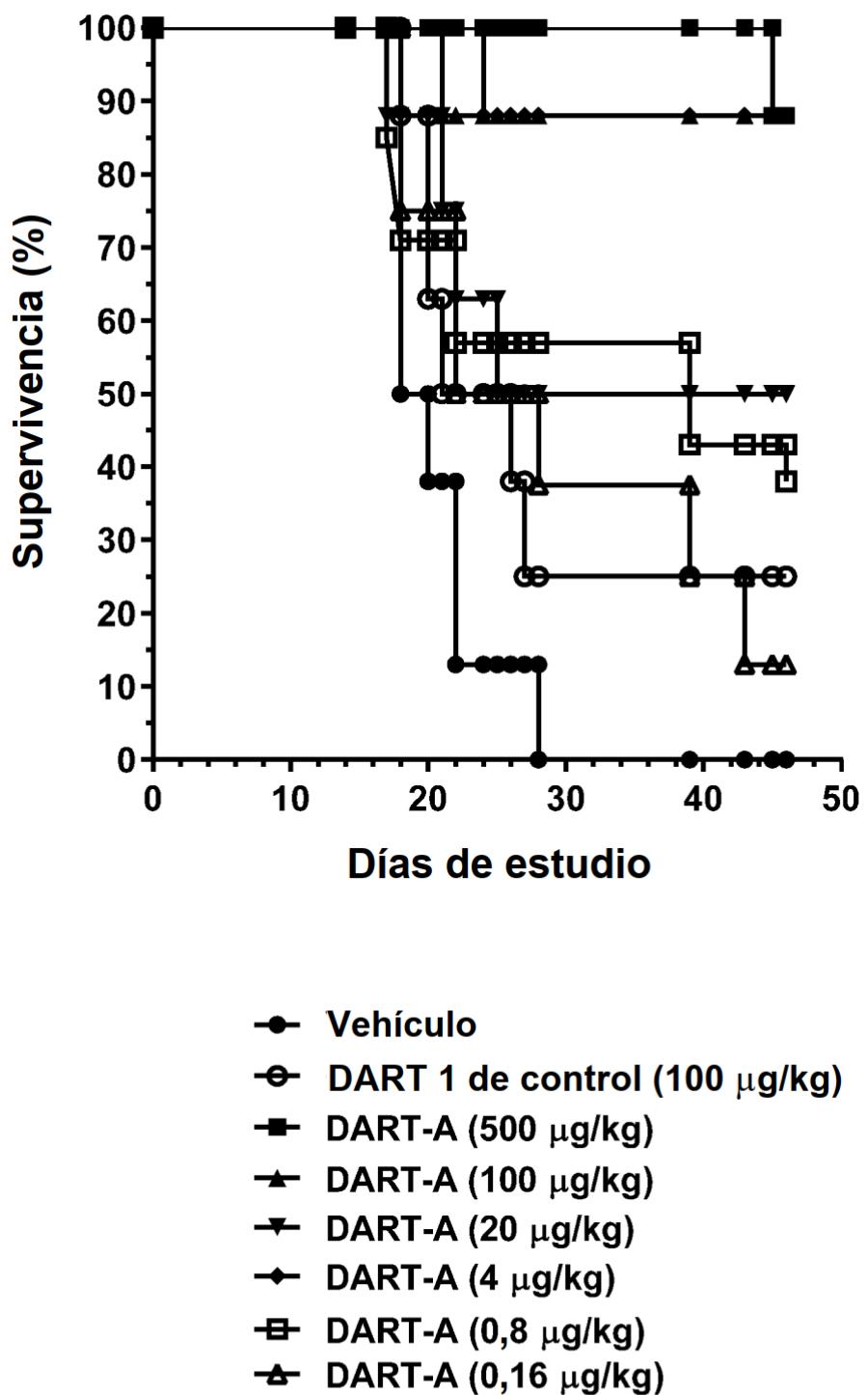
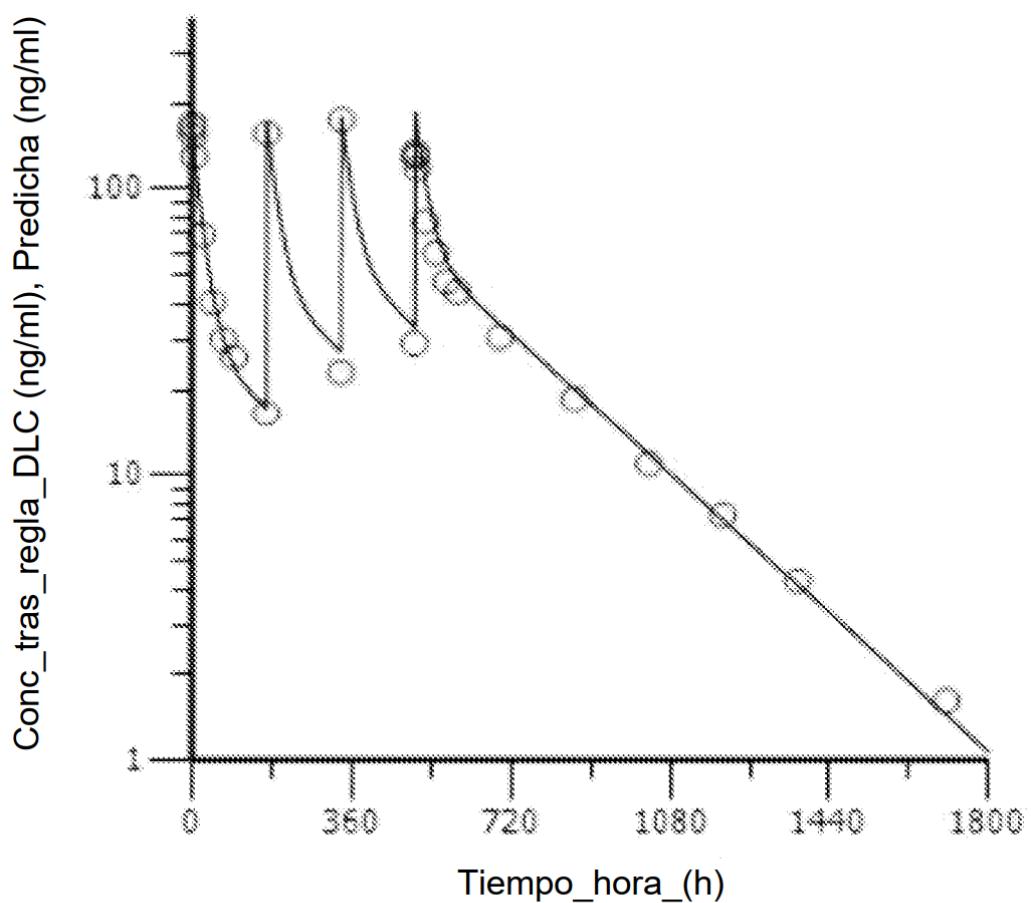


Figura 26



**Figura 27**

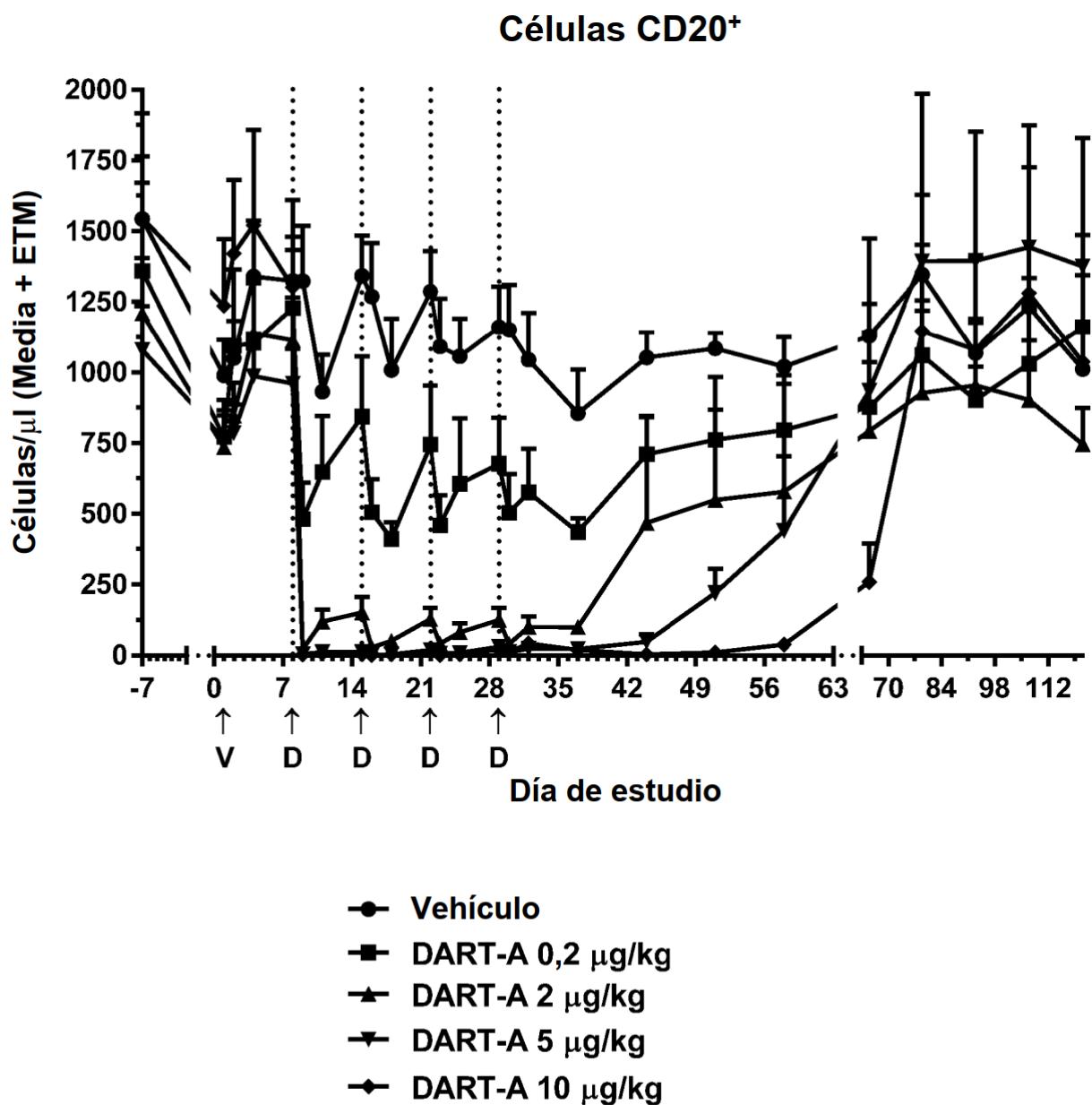
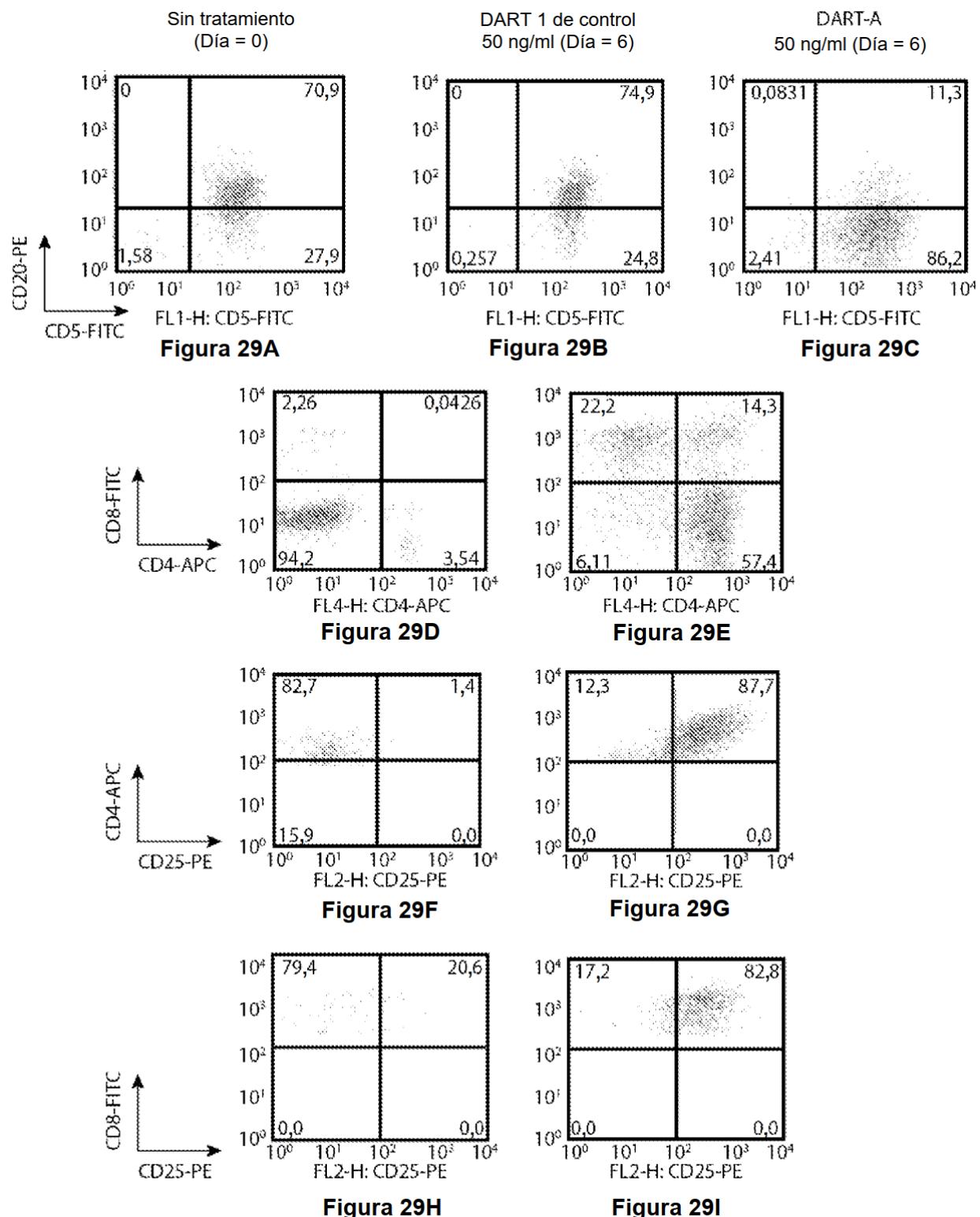


Figura 28



**Figuras 29A-29I**