(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 732 191**

(51) Int. CI.:

A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2009 PCT/US2009/068577**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010 WO10080538**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 09837939 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2376109**

(54) Título: **Diacuerpos covalentes y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

27.02.2009 US 156035 P
19.12.2008 US 139352 P
30.10.2009 US 256779 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

JOHNSON, LESLIE S. y
HUANG, LING

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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 covalentes y usos de los mismos

1. Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a moléculas de diacuerpo, también conocidas como "reactivos de redireccionamiento de afinidad dual" ("DART"). Las moléculas de diacuerpo de la divulgación comprenden al menos dos cadenas polipeptídicas que se asocian para formar al menos dos sitios de unión a epítopo, que pueden reconocer epítopos iguales o diferentes. Adicionalmente, los epítopos pueden ser de las mismas moléculas o de moléculas diferentes o estar ubicados en las mismas células o en células diferentes. Las cadenas polipeptídicas individuales de la molécula de diacuerpo pueden estar unidas de manera covalente mediante enlaces covalentes no peptídicos, tales como, pero sin limitación, enlaces disulfuro de restos de cisteína ubicados dentro de cada cadena polipeptídica. En realizaciones particulares, las moléculas de diacuerpo de la presente divulgación comprenden además una región Fc, que permite la modificación por ingeniería de la funcionalidad de tipo anticuerpo en la molécula.

2. Antecedentes de la invención

El diseño de los diacuerpos covalentes se basa en la construcción de Fv monocatenario (scFv) (Holliger et al. (1993) "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448). En una IgG intacta no modificada, los dominios VL y VH se ubican en diferentes cadenas polipeptídicas, es decir, la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente. La interacción de una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo y, en particular, la interacción de los dominios VL y VH forma uno de los sitios de unión a epítopo del anticuerpo. Por el contrario, la construcción de 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 a epítopo funcional. Cuando el autoensamblaje es imposible debido a un enlazador de insuficiente longitud (menor de aproximadamente 12 restos de aminoácido), dos de las construcciones scFv interactúan entre sí formando una molécula bivalente, asociándose la región VL de una cadena con la región VH de la otra (revisado en Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Además, la adición de un resto de cisteína al extremo C-terminal de la construcción ha demostrado permitir la unión por enlaces disulfuro de las cadenas polipeptídicas, estabilizando el dímero resultante sin interferir con las características de unión de la molécula bivalente (véase, por ejemplo, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27). Además, en los casos donde se seleccionan dominios VL y VH con diferente especificidad, puede construirse no solo una molécula bivalente, sino también biespecífica.

Los diacuerpos bivalentes tienen una gran variedad de aplicaciones que incluyen la terapia y el inmunodiagnóstico. La bivalencia permite tener gran flexibilidad en el diseño y la modificación por ingeniería del diacuerpo en diversas aplicaciones, proporcionando mejor avidez hacia los antígenos multiméricos, la reticulación de diferentes antígenos y la dirección dirigida a tipos específicos de células basándose en la presencia de ambos antígenos diana. Debido a su mayor valencia, las bajas constantes de disociación y el 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 también han demostrado un uso particular en el campo de la obtención de imágenes de tumores (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris", Protein Eng. 10:1221). Es de importancia particular la reticulación de diferentes células, por ejemplo, la reticulación 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 By A Bispecific Diabody", Protein Eng. 9:299-305). Los dominios de unión a epítopo de diacuerpos también pueden dirigirse a un determinante de superficie de cualquier célula efectora inmunitaria, tal como CD3, CD16, CD32 o CD64, que se expresan en linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK) u otras células mononucleares. En múltiples estudios, se observó que un diacuerpo de unión a determinantes de células efectoras, por ejemplo, Receptores Fcγ (FcγR), también activa a la célula efectora (Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody," Protein Eng. 9:299-305; Holliger et al. (1999) "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins", Cancer Res. 59:2909-2916). Normalmente, la activación de células efectoras se desencadena por la unión de un anticuerpo unido al antígeno a una célula efectora a través de la interacción de Fc y FcγR; por lo tanto, en este sentido, las moléculas de diacuerpo de la divulgación pueden exhibir una funcionalidad similar a Ig independientemente de si comprenden un dominio Fc (por ejemplo, como se ensayó en cualquier ensayo de función efectora conocido en la técnica o ejemplificado en el presente documento (por ejemplo, ensayo de ADCC)). Mediante la reticulación de células tumorales y efectoras, el diacuerpo no solo lleva la célula efectora a la proximidad de las células tumorales, sino que también conduce a la destrucción efectiva del tumor (véase, por ejemplo,, Cao et al. (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics," Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197).

2.1 RECEPTORES DE CÉLULAS EFECTORAS Y SUS PAPELES EN EL SISTEMA INMUNITARIO

En la función inmunitaria tradicional, la interacción de los complejos anticuerpo-antígeno con células del sistema inmunitario da lugar a una amplia selección de respuestas, que varían de las funciones efectoras tales como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la desgranulación de mastocitos y la fagocitosis ante señales inmunomoduladoras, tales como la regulación de la proliferación de linfocitos y la secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician a través de la unión del dominio Fc de los anticuerpos o complejos inmunitarios a receptores de superficie de células especializadas en células hematopoyéticas. La diversidad de las respuestas celulares desencadenadas por los anticuerpos y los complejos inmunitarios se debe a la heterogeneidad estructural de los receptores de Fc. Los receptores de Fc comparten dominios de unión al antígeno estructuralmente relacionados que supuestamente median en la señalización intracelular.

Los receptores de Fcγ, miembros de la superfamilia de proteínas de los genes de inmunoglobulina, son glucoproteínas de superficie que pueden unirse a la parte Fcγ de las moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce inmunoglobulinas de uno o más isotipos mediante un dominio de reconocimiento en la cadena alfa del receptor de Fcγ. Los receptores de Fcγ se definen por su especificidad hacia los subtipos de inmunoglobulina. Los receptores de Fcγ para la IgG se conocen como FcγR, para la IgE, como FcεR, y para la IgA, como FcαR. Diferentes células auxiliares portan receptores de Fcγ para anticuerpos de diferente isotipo, y el isotipo del anticuerpo determina qué células auxiliares participarán en una determinada respuesta (revisado por Ravetch J.V. et al. (1991) "Fc Receptors," Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92; Gerber J.S. et al. (2001) "Stimulatory And Inhibitory Signals Originating From The Macrophage Fcgamma Receptors," Microbes and Infection, 3: 131-139; Billadeau D.D. et al. (2002), "ITAMs Versus ITIMs: Striking A Balance During Cell Regulation", The Journal of Clinical Investigation, 2(109): 161-1681; Ravetch J.V. et al. (2000) "Immune Inhibitory Receptors," Science, 290: 84-89; Ravetch J.V. et al., (2001) "IgG Fc Receptors", Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. (1994) "Fc Receptors: Rubor Redux", Cell, 78(4): 553-60). Los diferentes receptores de Fcγ, las células que los expresan y su especificidad por el isotipo se resumen en la tabla 1 (adaptada de Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4.ª ed. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York).

Receptores de Fcγ

Cada miembro de esta familia es una glucoproteína integral de la membrana, que posee dominios extracelulares relacionados con un conjunto de tipo C2 de dominios relacionados con inmunoglobulinas, un solo dominio transmembrana y un dominio intracitoplasmático de longitud variable. Existen tres FcγR conocidos, denominados FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). Los tres receptores están codificados por distintos genes; sin embargo, la extensa homología entre los tres miembros de la familia sugiere que surgieron de un progenitor común, quizás mediante duplicación génica.

FcγRII(CD32)

Las proteínas FcγRII son glucoproteínas integrales de la membrana de 40 kDa que solo se unen a la IgG complejada debido a una baja afinidad hacia la Ig monomérica (10^6 M^{-1}). Este receptor es el receptor FcγR que se expresa más ampliamente, presente en todas las células hematopoyéticas, incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos B, linfocitos NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. FcγRII solo tiene dos regiones de tipo inmunoglobulina en su cadena de unión a inmunoglobulina y, por tanto, tiene una afinidad mucho menor hacia IgG que hacia FcγRI. Existen tres genes de FcγRII humanos (FcγRII-A, FcγRII-B, FcγRII-C), uniéndose todos ellos a IgG en agregados o complejos inmunitarios.

Distintas diferencias dentro de los dominios citoplasmáticos de FcγRII-A y FcγRII-B crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas ante la ligadura del receptor. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la señalización intracelular que conduce a la activación celular tal como puede ser la fagocitosis y el estallido respiratorio, mientras que la isoforma B inicia señales inhibidoras, por ejemplo, Inhibiendo la activación de los linfocitos B.

FcγRIII (CD16)

Debido a la heterogeneidad de esta clase, el tamaño de FcγRIII varía entre 40 y 80 kDa en el ratón y en el ser humano. Dos genes humanos codifican dos transcripciones, FcγRIIIA, una glucoproteína integral de la membrana y FcγRIIIB, una versión unida a glucosilfosfatidil-inositol (GPI). Un gen murino codifica un FcγRIII homólogo a FcγRIIIA humano que engloba la membrana. El FcγRIII comparte características estructurales con cada uno de los dos FcγR. Al igual que FcγRII, FcγRIII se une a IgG con baja afinidad y contiene los dos dominios de tipo Ig extracelulares correspondientes. FcγRIIIA se expresa en macrófagos, mastocitos y es el único FcγR en linfocitos NK. En la actualidad, se sabe que FcγRIIIB unido a GPI solo se expresa en neutrófilos humanos.

Señalización a través de FcγR

Las señales de activación e inhibición son transducidas a través de los FcγR tras la ligadura. Estas funciones diametralmente opuestas se deben a las diferencias estructurales entre las diferentes isoformas de los receptores. Dos dominios distintos dentro de los dominios de señalización citoplasmáticos del receptor denominados motivos de activación basados en tirosina de inmunoreceptores (ITAM) o motivos de inhibición basados en tirosina de inmunoreceptores (ITIM) son los responsables de las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplasmáticas en estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, mientras que los complejos que contienen ITIM solo incluyen FcγRIIB.

Los neutrófilos humanos expresan el gen de FcγRIIA. El agrupamiento de FcγRIIA a través de complejos inmunitarios o reticulación de anticuerpos específicos sirve para agregar los ITAM junto con las cinasas asociadas a receptores que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de los ITAM sirve como sitio de acoplamiento para Syk cinasa, cuya activación da como resultado la activación de sustratos aguas abajo (por ejemplo, PI_3K). La activación celular conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios.

El gen de FcγRIIB se expresa en los linfocitos B; su dominio extracelular es un 96 % idéntico a FcγRIIA y se une a los complejos de IgG de manera casi idéntica. La presencia de un ITIM en el dominio citoplasmático de FcγRIIB define esta subclase inhibidora de FcγR. Recientemente, se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se liga junto con un FcγR activador, el ITIM de FcγRIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza los mensajeros del fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina cinasa mediada por FcγR que contiene ITAM, impidiendo, por consiguiente, el flujo de entrada de Ca^{++} intracelular. De este modo, la reticulación de FcγRIIB atenúa la respuesta activadora a la ligadura de FcγR e inhibe la respuesta celular. De este modo, se suprimen la activación de linfocitos B, la proliferación de linfocitos B y la secreción de anticuerpos.

TABLA 1. Receptores para las regiones Fc de isotipos de inmunoglobulinas

Receptor	Unión	Tipo de célula	Efecto de la ligadura
FcγRI (CD64)	IgG1 10^8 M^{-1}	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Estimulación de la absorción, Activación del estallido respiratorio, Inducción de la muerte
FcγRII-A (CD32)	IgG1 2×10^6 M^{-1}	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas Plaquetas Células de Langerhans	Captación, liberación de gránulos
FcγRII(B2)	IgG1 2×10^6 M^{-1}	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Captación, Inhibición de estimulación
FcγRII-B1 (CD32)	IgG1 2×10^6 M^{-1}	Linfocitos B Mastocitos	Sin captación, Inhibición de la estimulación
FcγRIII (CD16)	IgG1 5×10^5 M^{-1}	Linfocitos NK Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Mastocitos	Inducción de la destrucción
Fcε RI	IgE 10^{10} M^{-1}	Mastocitos Eosinófilos Basófilos	Secreción de gránulos
Fcα RI (CD89)	IgA1, IgA2 10^7 M^{-1}	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Captación, Inducción de la destrucción

El documento US 2007/004909 se refiere a moléculas de diacuerpo y a sus usos en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos, incluyendo trastornos inmunológicos y cánceres, en donde las moléculas de diacuerpo incluyen al menos dos cadenas polipeptídicas que se asocian para formar al menos dos sitios de unión a epítopo.

3. Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una molécula de diacuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 del presente documento. Su uso puede ser en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo el cáncer, trastornos autoinmunitarios, trastornos alérgicos y enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias, hongos o virus. Preferentemente, el diacuerpo de la presente divulgación puede unirse a dos epítopos diferentes en dos células diferentes, en donde el primer epítopo se expresa en un tipo de célula diferente a la del segundo epítopo, de modo que el diacuerpo puede unir las dos células entre sí.

En ciertos aspectos de la molécula de diacuerpo, el primer epítopo, el segundo epítopo y cuando proceda, el tercer y cuarto epítopo pueden ser iguales. En otros aspectos, el primer epítopo, el segundo epítopo y cuando proceda, el tercer y cuarto epítopo pueden ser diferentes entre sí. En ciertos aspectos de la molécula de diacuerpo que comprenden un tercer dominio de unión a epítopo, el primer epítopo y el tercer epítopo pueden ser iguales. En ciertos aspectos de la molécula de diacuerpo que comprenden un cuarto dominio de unión a epítopo, el primer y cuarto epítopo pueden ser iguales. En ciertos aspectos de la molécula de diacuerpo que comprenden un tercer dominio de unión a epítopo, el segundo epítopo y el tercer epítopo pueden ser iguales. En ciertos aspectos de la molécula de diacuerpo que comprenden un cuarto dominio de unión a epítopo, el segundo y cuarto epítopo pueden ser iguales. En aspectos preferidos de la molécula de diacuerpo, el primer epítopo y el segundo epítopo son diferentes. En otros aspectos más de la molécula de diacuerpo que comprenden un tercer dominio de unión al epítopo y un cuarto dominio de unión a epítopo, el tercer y cuarto epítopo pueden ser diferentes. Se ha de entender que cualquier combinación de los anteriores está comprendida en la presente divulgación.

En aspectos particulares de la molécula de diacuerpo, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo pueden derivarse de la misma inmunoglobulina. En otro aspecto, el segundo dominio y el cuarto dominio del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo pueden derivarse de la misma inmunoglobulina. En otro aspecto más, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o de la molécula del diacuerpo pueden derivarse de una inmunoglobulina diferente. En otro aspecto más, el segundo dominio y el cuarto dominio del diacuerpo o de la molécula del diacuerpo pueden derivarse de una inmunoglobulina diferente. Se ha de entender que cualquier combinación de los anteriores está comprendida en la presente divulgación.

En ciertos aspectos de la molécula de diacuerpo, la unión covalente entre la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica del diacuerpo o de molécula de diacuerpo puede ser a través de un enlace disulfuro entre al menos un resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica y al menos un resto de cisteína de la segunda cadena polipeptídica. Los restos de cisteína en la primera o segunda cadenas polipeptídicas que son responsables de los enlaces disulfuro pueden encontrarse en cualquier parte de la cadena polipeptídica, así como dentro de los dominios primero, segundo, tercero, cuarto, quinto y sexto. En una realización específica, el resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica se encuentra en el primer dominio y el resto de cisteína de la segunda cadena polipeptídica se encuentra en el quinto dominio. Los dominios primero, segundo, cuarto y quinto corresponden a las regiones variables responsables de la unión. En las realizaciones preferidas, los restos de cisteína responsables de los enlaces disulfuro entre la primera y segunda cadena polipeptídica se ubican dentro de los dominios tercero y sexto, respectivamente. En un aspecto particular de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23) que puede estar codificada por la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17). En otro aspecto de dicha realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23) que puede estar codificada por la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17). En otro aspecto más de dicha realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77), derivada del dominio bisagra de una IgG humana y que puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 78). En otro aspecto de dicha realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77), derivada del dominio bisagra de una IgG humana y que puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 78). En determinados aspectos de dicha realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23); y el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77). En otros aspectos de la dicha realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77). En otros aspectos más de la dicha realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23); y el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende un dominio bisagra. En otros aspectos de la dicha realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende el dominio bisagra. En otros aspectos más de la dicha realización, el tercer dominio de la primera cadena

polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23); y el sexto dominio de la primera cadena polipeptídica comprende un dominio Fc o una parte del mismo. En otros aspectos más de dicha realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende un dominio Fc o una parte del mismo.

En otras realizaciones, los restos de cisteína de la primera o segunda cadena polipeptídica que son responsables de los enlaces disulfuro pueden estar ubicados fuera del primer, segundo o tercer dominios de la primera cadena polipeptídica y fuera del cuarto, quinto y sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica. En particular, el resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al primer dominio o puede ser C-terminal respecto al primer dominio. El resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al segundo dominio o puede ser C-terminal respecto al segundo dominio. El resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al tercer dominio o puede ser C-terminal respecto al tercer dominio. Además, el resto de cisteína de la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al cuarto dominio o puede ser C-terminal respecto al cuarto dominio. El resto de cisteína de la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al quinto dominio o puede ser C-terminal respecto al quinto dominio. Por consiguiente, el resto de cisteína de la segunda cadena polipeptídica puede ser C-terminal respecto al sexto dominio o puede ser N-terminal respecto al sexto dominio. En un aspecto particular, el enlace disulfuro puede estar entre al menos dos restos de cisteína de la primera cadena polipeptídica y al menos dos restos de cisteína de la segunda cadena polipeptídica. En un aspecto particular, en donde el tercer dominio y el sexto dominio no comprenden un dominio Fc, o una parte del mismo, el resto de cisteína puede estar en el extremo C-terminal de la primera cadena polipeptídica y en el extremo C-terminal de la segunda cadena polipeptídica. Se ha de entender que cualquier combinación de los anteriores está comprendida en la presente divulgación.

En realizaciones específicas de la molécula de diacuerpo descritas anteriormente, el diacuerpo covalente de la divulgación engloba dímeros de moléculas de diacuerpo, en donde cada molécula de diacuerpo comprende una primera y una segunda cadenas polipeptídicas. En ciertos aspectos de dicha realización, las moléculas de diacuerpo pueden estar unidas de manera covalente para formar el dímero, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico. En aspectos preferidos de dicha realización, la unión covalente es un enlace disulfuro entre al menos un resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica de cada una de las moléculas de diacuerpo del dímero. En aspectos aún más preferidos de esta molécula de diacuerpo, la unión covalente es un enlace disulfuro entre al menos un resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica de cada una de las moléculas de diacuerpo que forman el dímero, en donde dicho al menos un resto de cisteína está ubicado en el tercer dominio de cada primera cadena polipeptídica.

En ciertos aspectos de la molécula de diacuerpo, el primer dominio de la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al segundo dominio o puede ser C-terminal respecto al segundo dominio. El primer dominio de la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al tercer dominio o puede ser C-terminal respecto al tercer dominio. El segundo dominio de la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al primer dominio o puede ser C-terminal respecto al primer dominio. Además, el segundo dominio de la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al tercer dominio o puede ser C-terminal respecto al tercer dominio. Por consiguiente, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al primer dominio o puede ser C-terminal respecto al primer dominio. El tercer dominio de la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al segundo dominio o puede ser C-terminal respecto al segundo dominio. Con respecto a la segunda cadena polipeptídica, el cuarto dominio puede ser N-terminal respecto al quinto dominio o puede ser C-terminal respecto al quinto dominio. El cuarto dominio puede ser N-terminal respecto al sexto dominio o puede ser C-terminal respecto al sexto dominio. El quinto dominio de la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al cuarto dominio o puede ser C-terminal respecto al cuarto dominio. El quinto dominio de la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al sexto dominio o puede ser C-terminal respecto al sexto dominio. Por consiguiente, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al cuarto dominio o puede ser C-terminal respecto al cuarto dominio. El sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al quinto dominio o puede ser C-terminal respecto al quinto dominio. Se ha de entender que cualquier combinación de los anteriores está comprendida en la presente divulgación.

En determinadas realizaciones, el primer dominio y el segundo dominio pueden ubicarse en C-terminal respecto al tercer dominio en la primera cadena polipeptídica; o el primer dominio y el segundo dominio pueden ubicarse en N-terminal respecto al tercer dominio en la primera cadena polipeptídica. Con respecto a la segunda cadena polipeptídica, el cuarto dominio y el quinto dominio pueden ubicarse en C-terminal respecto al sexto dominio o el cuarto dominio y el quinto dominio pueden ubicarse en N-terminal respecto al sexto dominio. En determinados aspectos de dicha realización, la presente divulgación se refiere a un diacuerpo biespecífico covalente, siendo dicho diacuerpo un dímero de moléculas de diacuerpo, comprendiendo cada molécula de diacuerpo una primera y una segunda cadena polipeptídica, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítopo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítopo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o una porción del mismo, cuyos primeros y segundos dominios están ligados

covalentemente de manera que los dominios primero y segundo no se asocian para formar un sitio de unión a epítopo y en donde el tercer dominio está ubicado en N-terminal respecto tanto al primer dominio como al segundo dominio; y cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyos dominios cuarto y quinto están unidos covalentemente, de tal forma que los dominios cuarto y quinto no se asocian para formar un sitio de unión a epítopo; y en donde la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica de cada molécula de diacuerpo están unidas covalentemente, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico; en donde el primer dominio y el quinto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al primer epítopo; en donde el segundo dominio y el cuarto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítopo.

Como se ha analizado anteriormente, los dominios de las cadenas polipeptídicas individuales están unidos de manera covalente. En aspectos específicos, el enlace covalente entre el primer y segundo dominio, el primer y tercer dominio, el segundo y tercer dominio, el cuarto y quinto dominio, el cuarto y sexto dominio y/o el quinto y sexto dominio puede ser un enlace peptídico. En particular, el primer y segundo dominio y el cuarto y quinto dominio pueden estar separados por el tercer dominio y el sexto dominio, respectivamente o por restos de aminoácidos adicionales, siempre que el primer y segundo y el cuarto y quinto dominio no se asocien para formar un sitio de unión. El número de restos de aminoácido puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos de aminoácido. En un aspecto preferido, el número de restos de aminoácido entre los dominios es de 8.

En ciertos aspectos de la molécula de diacuerpo, los dominios de la primera y la segunda cadena polipeptídica que comprenden un dominio Fc, es decir, opcionalmente, el tercer y sexto dominio, respectivamente, pueden comprender además un dominio bisagra de modo que el dominio comprenda una región bisagra-Fc. En realizaciones alternativas, la primera cadena polipeptídica o la segunda cadena polipeptídica pueden comprender un dominio bisagra sin comprender también un dominio Fc. Las cadenas pesadas, cadenas ligeras, regiones bisagra, dominios Fc y/o dominios bisagra-Fc para su uso en la molécula de diacuerpo pueden obtenerse de cualquier tipo de inmunoglobulina, incluyendo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En un aspecto preferido, el tipo de inmunoglobulina es IgG o cualquier subtipo de la misma, es decir, IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4. En otros aspectos, la inmunoglobulina de la que se obtienen las cadenas ligeras y pesadas está humanizada o quimerizada.

Además, el primer epítopo y el segundo epítopo son diferentes y, cuando sea aplicable, el tercer epítopo y el cuarto epítopo, al que se une el diacuerpo o la molécula de diacuerpo pueden ser diferentes epítopos del mismo antígeno o pueden ser diferentes epítopos de antígenos diferentes. Los antígenos pueden ser cualquier molécula contra la que se pueda generar un anticuerpo. Por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, toxinas bacterianas, marcadores de superficie celular, marcadores autoinmunes, proteínas víricas, fármacos, etc. En aspectos particulares, al menos un sitio de unión a epítopo del diacuerpo es específico para un antígeno en una determinada célula, tal como un linfocito B, un linfocito T, una célula fagocítica, un linfocito citolítico natural (NK) o una célula dendrítica.

En ciertos aspectos de la presente realización, al menos un sitio de unión a epítopo del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo es específico para un receptor de Fc, pudiendo ser dicho receptor de Fc un receptor de Fc activador o un receptor de Fc inhibidor. En aspectos particulares, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ y el receptor de Fcγ es un receptor FcγRI, FcγRII o FcγRIII. En aspectos más preferidos, el receptor FcγRIII es un receptor FcγRIIIA (CD16A) o el receptor FcγRIIIB (CD16B), y, más preferentemente, el receptor FcγRIII es el receptor FcγRIIIA (CD16A). En otro aspecto preferido, el receptor FcγRII es el receptor FcγRIIA (CD32A) o el receptor FcγRIIB (CD32B) y más preferentemente, el receptor FcγRIIB (CD32B). En un aspecto particularmente preferido, un sitio de unión del diacuerpo es específico para CD32B y el otro sitio de unión es específico para CD16A. En una realización específica de la molécula de diacuerpo, al menos un sitio de unión a epítopo del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo es específico para un receptor de Fc activador y al menos otro sitio es específico para un receptor de Fc inhibidor. En ciertos aspectos de dicha realización, el receptor de Fc activador es CD32A y el receptor de Fc inhibidor es CD32B. En otros aspectos de dicha realización, el receptor de Fc activador es BCR y el receptor de Fc inhibidor es CD32B. En otros aspectos más de dicha realización, el receptor de Fc activador es IgERI y el receptor de Fc inhibidor es CD32B.

En los casos donde un sitio de unión a epítopo es específico para CD16A, los dominios VL y VH pueden ser iguales o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo 3G8 murino, cuya secuencia ha sido clonada y se expone en el presente documento. En otros casos donde un sitio de unión a epítopo es específico para CD32A, los dominios VL y VH pueden ser iguales o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo IV.3 de ratón. En otros casos más donde un sitio de unión a epítopo es específico para CD32B, los dominios VL y VH pueden ser iguales o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo 2B6 murino, cuya secuencia ha sido clonada y se expone en el presente documento. Se ha de entender que cualquiera de los dominios VL o VH de los anticuerpos 3G8, 2B6 e IV.3 puede usarse en cualquier combinación. La presente divulgación también se refiere a un diacuerpo o a una molécula de diacuerpo biespecífico, en donde el primer epítopo es específico para CD32B y el segundo epítopo es específico para CD16A.

En otros aspectos, un sitio de unión a epítopo puede ser específico para un antígeno patógeno. Como se usa en el presente documento, un antígeno patogénico es un antígeno implicado en una enfermedad patógena específica, incluyendo el cáncer, infección y enfermedad autoinmunitaria. Por lo tanto, el antígeno patógeno puede ser un antígeno tumoral, un antígeno bacteriano, un antígeno vírico o un antígeno autoinmunitario. Los antígenos patógenos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, lipopolisacárido, antígenos víricos seleccionados de grupo que consiste en antígenos víricos de virus de la inmunodeficiencia humana, adenovirus, virus sincitial respiratorio, virus del Nilo Occidental (por ejemplo, los antígenos E16 y/o E53) y virus de hepatitis, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y colágeno. Preferentemente, el antígeno patógeno es un antígeno neutralizante. En un aspecto preferido, cuando un sitio de unión a epítopo es específico para CD16A o CD32A, el otro sitio de unión a epítopo es específico para un antígeno patógeno, excluyendo los antígenos autoinmunitarios. En otro aspecto preferido más, cuando un sitio de unión a epítopo es específico para CD32B, el otro sitio de unión a epítopo es específico para cualquier antígeno patógeno. En realizaciones específicas, la molécula de diacuerpo de la divulgación se une a dos antígenos diferentes en la misma célula, por ejemplo, un sitio de unión a antígeno es específico para un receptor de Fc activador, mientras que el otro es específico para un receptor de Fc inhibidor. En otras realizaciones, la molécula de diacuerpo se une a dos epítopos neutralizantes víricos diferentes, por ejemplo, pero sin limitación, E16 y E53 del virus del Nilo Occidental.

Los diacuerpos de la divulgación se pueden usar para tratar una variedad de enfermedades y trastornos. Se describe un método para tratar una enfermedad o trastorno que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de una molécula de diacuerpo o diacuerpo covalente de la divulgación en la que al menos un sitio de unión es específico para un antígeno patógeno, tal como un antígeno expresado en la superficie de una célula cancerosa o en la superficie de una bacteria o de un virión y al menos otro sitio de unión es específico para un receptor de Fc, por ejemplo, CD16A.

También se describe un método para tratar una enfermedad o trastorno que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un diacuerpo o una molécula de diacuerpo de la divulgación, en el que al menos un sitio de unión es específico para CD32B y al menos otro sitio de unión es específico para CD16A.

También se describe un método para inducir tolerancia inmune a un antígeno patógeno que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un diacuerpo covalente o una molécula de diacuerpo covalente de la divulgación, en el que al menos un sitio de unión es específico para CD32B y al menos otro sitio de unión es específico para dicho antígeno patógeno. En aspectos de dicha realización, el antígeno patógeno puede ser un alérgeno u otra molécula hacia la que se desee tolerancia inmunitaria, tal como una proteína expresada en tejido trasplantado.

También se describe un método para la detoxificación que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de una molécula de diacuerpo o diacuerpo covalente de la divulgación, en el que al menos un sitio de unión es específico para un marcador de superficie celular y al menos otro sitio de unión es específico para una toxina. El diacuerpo de la divulgación administrado puede ser uno donde un sitio de unión es específico para un marcador de la superficie celular, tal como un Fc y el otro sitio de unión es específico para una toxina bacteriana o para un fármaco. El marcador de la superficie celular puede no encontrarse en glóbulos rojos.

3.1 Definiciones

A menos que se definan de otra manera, todos los términos de la técnica, notaciones y otros términos o terminología científicos que se usan en el presente documento pretenden tener los significados comúnmente comprendidos por los expertos en la materia a la que pertenece la presente divulgación. En algunos casos, los términos con significados comúnmente comprendidos se definen en el presente documento con fines de claridad y/o para tener una referencia inmediata, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no se ha de considerar necesariamente como representativa de una diferencia sustancial frente a lo que se comprende en la técnica. La práctica de la presente divulgación empleará, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que están dentro de las habilidades en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tales como, Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1999, incluyendo los suplementos hasta 2001); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, incluyendo los suplementos hasta 2001); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); The Immunoassay Handbook (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); Bioconjugate Techniques (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); Methods of Immunological Analysis (R. Masseyeff, W. H. Albert y N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow y Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999; y Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2000).

Como se usa en el presente documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos

monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos Fv biespecíficos unidos por enlaces disulfuro (sdFv), intracuerpos y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id para los anticuerpos de la divulgación y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2) o subclase.

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une de manera inmunoespecífica", "reconoce de manera inmunoespecífica", "se une de manera específica", "reconoce específicamente" y las expresiones análogas se refieren a moléculas que se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, epítopo o complejo inmunitario) y no se une específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad según se determina mediante, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferentemente, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no tienen reacción cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un antígeno pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Como se usa en el presente documento, "complejo inmunitario" se refiere a una estructura que se forma cuando al menos una molécula diana y al menos un polipéptido que contiene la región Fcγ heterólogo se une a otro formando un complejo de mayor peso molecular. Los ejemplos de complejos inmunitarios son complejos de antígeno-anticuerpo que pueden o bien ser solubles o encontrarse en partículas (por ejemplo, un complejo antígeno/anticuerpo sobre una superficie celular).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "cadena pesada", "cadena ligera", "región variable", "región marco conservada", "dominio constante" y similares, tienen su significado común en la técnica inmunológica, y se refieren a los dominios de las inmunoglobulinas naturales y a los dominios correspondientes de las proteínas de unión sintéticas (por ejemplo, recombinantes) (por ejemplo, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos, etc.). La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas naturales (por ejemplo, IgG) es un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, normalmente expresadas como una glucoproteína de aproximadamente 150.000 Da. La parte amino-terminal ("N") de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La parte carboxi-terminal ("C") de cada cadena define una región constante, teniendo las cadenas ligeras un solo dominio constante y teniendo normalmente las cadenas pesadas tres dominios constantes y una región bisagra. Por lo tanto, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula de IgG es n-V_L-C_L-c y la estructura de las cadenas pesadas de IgG es n-V_H-C_{H1}-H-C_{H2}-C_{H3}-c (donde H es la región bisagra). Las regiones variables de una molécula de IgG constan de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que contienen los restos que están en contacto con el antígeno y segmentos que no son CDR, a los que se conoce como segmentos marco, que, en general, mantienen la estructura y determinan el posicionamiento de los bucles de CDR (aunque ciertos restos marco también pueden estar en contacto con el antígeno). Por lo tanto, los dominios V_L y V_H tienen la estructura n-FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4-c.

Cuando se hace referencia a las proteínas o anticuerpos de unión (como se definen ampliamente en el presente documento), la asignación de los aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991). Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras maduras de las inmunoglobulinas se designan por la posición de un aminoácido en la cadena. Kabat describió numerosas secuencias de aminoácidos para los anticuerpos, identificó una secuencia consenso de aminoácidos para cada subgrupo y asignó un número de restos a cada aminoácido. El esquema de numeración de Kabat puede extenderse a los anticuerpos no incluidos en su compendio alineando el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias consenso en Kabat haciendo referencia a aminoácidos conservados. Este método para asignar números de restos se ha vuelto una norma en el campo e identifica fácilmente los aminoácidos en posiciones equivalentes de diferentes anticuerpos, Incluyendo las variantes quiméricas o humanizadas. Por ejemplo, un aminoácido que está en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo murino.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cadena pesada" se usa para definir la cadena pesada de un anticuerpo IgG. En una IgG intacta nativa, la cadena pesada comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, bisagra, CH2 y CH3. A lo largo de la presente memoria descriptiva, la numeración de los restos en una cadena pesada de IgG es la del índice de EU tal como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991). El "índice de EU como en Kabat" se refiere a la numeración del anticuerpo EU de IgG1 humano. Los ejemplos de secuencias de aminoácidos que contienen los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 humana se muestran en las FIG. 1A y 1B, como se describe más adelante. Las FIG. 1A y 1B también exponen secuencias de aminoácidos de los dominios bisagra, CH2 y CH3 de las cadenas pesadas de IgG2, IgG3 y IgG4. Las secuencias de aminoácidos de los isotipos IgG2, IgG3 e IgG4 se alinean con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último resto de cisteína de las respectivas regiones bisagra, lo que forma los enlaces S-S entre

las cadenas pesadas, en las mismas posiciones. Para la región bisagra de IgG2 e IgG3, no todos los restos están numerados mediante el índice de EU.
La "región bisagra" o "dominio bisagra", en general, se define como el tramo desde Glu216 hasta Pro230 de la IgG1 humana. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la región bisagra de la IgG1 humana se presenta en la FIG. 1A (los restos de aminoácido de la FIG. 1A están numerados de acuerdo con el sistema de Kabat). Las regiones bisagra de los otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último resto de cisteína que forman los enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones como se muestra en la FIG. 1A.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región Fc", "dominio Fc" o expresiones análogas se usan para definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. En la FIG. 1B se muestra un ejemplo de la secuencia de aminoácidos que contiene la IgG1 humana. Aunque los límites pueden variar ligeramente, según la numeración de acuerdo con el sistema de Kabat, el dominio Fc se extiende desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 447 (los restos de aminoácido de la FIG. 1B están numerados de acuerdo con el sistema de Kabat). La FIG. 1B también proporciona ejemplos de las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc de los isotipos de IgG IgG2, IgG3 e IgG4.

La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde los aminoácidos 231 hasta el aminoácido 341 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (FIG. 1B). El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde los aminoácidos 342 hasta 447 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (FIG. 1B). El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana (al que también se le conoce como dominio "Cγ2") tiene la exclusividad de que no se aparea estrechamente con otro dominio. En cambio, dos cadenas de hidratos de carbono ramificadas unidas a N se interponen entre los dos dominios CH2 de una IgG natural, intacta.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "proteína de unión al FcγR", "anticuerpo contra FcγR" y "anticuerpo anti-FcγR", se usan de manera indistinta y se refieren a una variedad de proteínas de tipo inmunoglobulina o derivadas de inmunoglobulina. Las "proteínas de unión a FcγR" se unen a FcγR a través de una interacción con los dominios V_L y/o V_H (a diferencia de la unión mediada por Fcγ). Los ejemplos de proteínas de unión a FcγR incluyen anticuerpos completamente humanos, policlonales, quiméricos y humanizados (por ejemplo, que comprenden 2 cadenas pesadas y 2 ligeras), fragmentos de los mismos (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv), anticuerpos bifuncionales o multifuncionales (véase, por ejemplo, Lanzavecchia et al. (1987) "The Use Of Hybrid Hybridomas To Target Human Cytotoxic T Lymphocytes", Eur. J. Immunol. 17:105-111), anticuerpos monocatenarios (véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-26), proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión de presentación en fagos), "minicuerpos" (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.837.821) y otras proteínas de unión a antígeno que comprenden un dominio V_L y/o V_H o fragmento del mismo. En un aspecto, la proteína de unión a FcγRIIIA es un "anticuerpo tetramérico" es decir, que, en general, tiene la estructura de una IgG natural y que comprende dominios variables y constantes, es decir, dos cadenas ligeras que comprenden un dominio V_L y un dominio constante de cadena ligera y dos cadenas pesadas que comprenden un dominio V_H y dominios bisagra y constante de cadena pesada.

Como se usa en el presente documento, la expresión "antagonistas de FcγR" y las expresiones análogas se refieren a sustancias proteicas y no proteicas, incluyendo las moléculas pequeñas que antagonizan en al menos una actividad biológica de un FcγR, por ejemplo, bloquean la señalización. Por ejemplo, las moléculas de la divulgación bloquean la señalización bloqueando la unión de las IgG a un FcγR.

Como se usa en el presente documento, el término "derivado", en el contexto de los polipéptidos o de las proteínas, se refiere a un polipéptido o a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que ha sido modificada mediante la introducción de sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos. eliminaciones o adiciones. El término "derivado" como se usa en el presente documento también se refiere a un polipéptido o a una proteína que se ha modificado, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o a la proteína. Por ejemplo, pero sin limitación, un anticuerpo puede modificarse, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un antígeno u otra proteína celular, etc. Un polipéptido o una proteína derivada puede producirse mediante modificaciones químicas usando las técnicas conocidas por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un derivado de polipéptido o de proteína presenta una función similar o idéntica a la del polipéptido o la proteína del que se derivó.

Como se usa en el presente documento, el término "derivado" en el contexto de un derivado no proteico se refiere a una segunda molécula orgánica o inorgánica que se forma basándose en la estructura de una primera molécula orgánica o inorgánica. Un derivado de una molécula orgánica incluye, pero sin limitación, una molécula modificada, por ejemplo, mediante la adición o eliminación de un grupo hidroxilo, metilo, etilo, carboxilo o amina. Una molécula orgánica también puede esterificarse, alquilarse y/o fosforilarse.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de diacuerpo" se refiere a un complejo de dos o más cadenas polipeptídicas o proteínas, que comprenden cada una al menos un dominio VL y un dominio VH o fragmento de los mismos, en donde ambos dominios están comprendidos dentro de una sola cadena polipeptídica. En ciertas realizaciones, "molécula de diacuerpo" incluye moléculas que comprenden un dominio Fc o un dominio bisagra-Fc. Dichas cadenas polipeptídicas del complejo pueden ser iguales o diferentes, es decir, la molécula de diacuerpo puede ser un homomultímero o un heteromultímero. En aspectos específicos, la expresión "molécula de diacuerpo" incluye dímeros o tetrámeros o dichas cadenas polipeptídicas que contienen tanto un dominio VL y VH. Las cadenas polipeptídicas individuales que comprenden las proteínas multiméricas pueden estar unidas de manera covalente a al menos otro péptido del multímero por enlaces disulfuro entre las cadenas.

Como se usa en el presente documento, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan de manera indistinta para referirse a un estado en un sujeto. En particular, la expresión "enfermedad autoinmunitaria" se usa indistintamente con la expresión "trastorno autoinmunitario" para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por lesión celular, tisular y/u orgánica provocada por una reacción inmunológica del sujeto contra sus propias células, tejidos y/u órganos. La expresión "enfermedad inflamatoria" se usa indistintamente con la expresión "trastorno inflamatorio" para referirse a una afección en un sujeto, caracterizado por inflamación, preferentemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden estar asociados o no con la inflamación. Además, la inflamación puede estar provocada o no por un trastorno autoinmunitario. Por lo tanto, algunos trastornos pueden caracterizarse tanto como trastornos autoinmunitarios como inflamatorios.

"Cadenas polipeptídicas idénticas", como se usa en el presente documento, también se refiere a cadenas polipeptídicas que tengan una secuencia de aminoácidos casi idéntica, por ejemplo, incluyendo las cadenas que tienen una o más diferencias de aminoácidos, preferentemente sustituciones conservativas de aminoácidos, de modo que la actividad de las dos cadenas polipeptídicas no sea significativamente diferente.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a una neoplasia o a un tumor resultante del crecimiento no controlado, anómalo, de las células. Como se usa en el presente documento, el cáncer incluye explícitamente leucemias y linfomas. En algunas realizaciones, cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otras realizaciones, el cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales adyacentes y se dispersa a sitios distantes. En algunas realizaciones, el cáncer se asocia con un antígeno específico de cáncer.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente inmunomodulador" y variaciones de la misma se refieren a un agente que modula el sistema inmunitario de un hospedador. En determinadas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En determinadas realizaciones diferentes, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos y moléculas orgánicas.

Como se usa en el presente documento, el término "epítopo" se refiere a un fragmento de un polipéptido o de una proteína o una molécula no proteica que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente en un mamífero y lo más preferentemente, en un ser humano. Un epítopo que tiene actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o de una proteína que genera una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítopo que tiene actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o de una proteína al que se une de manera inmunoespecífica un anticuerpo, como se determina mediante cualquier método bien conocido por un experto en la materia, por ejemplo, mediante inmunoensayos. No es necesario que los epítopos antigénicos sean inmunogénicos.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos de aminoácidos contiguos, al menos 10 restos de aminoácidos contiguos, al menos 15 restos de aminoácidos contiguos, al menos 20 restos de aminoácidos contiguos, al menos 25 restos de aminoácidos contiguos, al menos 40 restos de aminoácidos contiguos, al menos 50 restos de aminoácidos contiguos, al menos 60 restos de aminoácidos contiguos, al menos 70 restos de aminoácidos contiguos, al menos 80 restos de aminoácidos contiguos, al menos 90 restos de aminoácidos contiguos, al menos 100 restos de aminoácidos contiguos, al menos 125 restos de aminoácidos contiguos, al menos 150 restos de aminoácidos contiguos, al menos 175 restos de aminoácidos contiguos, al menos 200 restos de aminoácidos contiguos o al menos 250 restos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido conserva al menos una función del polipéptido.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácidos nucleicos" y "secuencias de nucleótidos" incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas híbridas de ADN/ARN y análogos de moléculas de ADN o ARN. Dichos análogos pueden generarse usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, pero sin limitación, inosina o bases tritiladas. Dichos análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden estructuras principales modificadas que les otorgan atributos beneficiosos para las moléculas, tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas o una capacidad aumentada para atravesar membranas celulares. Los ácidos

nucleicos o las secuencias de nucleótidos pueden ser monocatenarios, bicatenarios, pueden contener partes monocatenarias y bicatenarias y pueden contener partes tricatenarias, pero es, preferentemente, ADN bicatenario.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o controlar un trastorno o una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retardar o reducir al mínimo el inicio de la enfermedad, por ejemplo, retardar o reducir al mínimo la propagación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad de agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o control de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la divulgación significa la cantidad de agente terapéutico solo, o combinado con otros tratamientos, que proporciona un beneficio terapéutico para el tratamiento o control de una enfermedad.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier agente que se pueda usar para la prevención de un trastorno, o la prevención de la recurrencia o propagación de un trastorno. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente profiláctico suficiente para impedir la recurrencia o la propagación de una enfermedad hiperproliferativa, en particular, cáncer o la presencia de dicha enfermedad en un paciente, incluyendo, pero sin limitación, aquellos que están predispuestos a la enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo, aquellos que están genéticamente predispuestos al cáncer o previamente expuestos a agentes cancerígenos. Una cantidad profilácticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente profiláctico que proporcione un beneficio profiláctico para la prevención de una enfermedad. Además, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a un agente profiláctico de la divulgación significa aquella cantidad de agente profiláctico solo, o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico para la prevención de la enfermedad.

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "en combinación" se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico. El uso de la expresión "en combinación" no limita el orden en el que se administran los agentes profilácticos y/o terapéuticos a un sujeto con un trastorno. Un primer agente profiláctico o terapéutico puede administrarse antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), de manera concomitante con, o después de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto con un trastorno.

"Función efectora" como se usa en el presente documento significa un evento bioquímico debido a la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor de Fc o un antígeno. Las funciones efectoras incluyen, pero sin limitación, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las funciones efectoras incluyen aquellas que tienen lugar tras la unión de un antígeno y aquellas que tienen lugar independientes de la unión al antígeno.

"Célula efectora", como se usa en el presente documento, significa una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores de Fc y media en una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, pero sin limitación, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, linfocitos B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, linfocitos citolíticos naturales (NK) y pueden ser de cualquier organismo incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente a un complejo inmunitario" y las expresiones análogas se refieren a moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario y no se unen específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un complejo inmunitario puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad según lo determinado mediante, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferentemente, las moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario no tienen reacción cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Una "proteína de fusión estable", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína de fusión que experimenta un nivel de degradación mínimo a no detectable durante la producción y/o almacenamiento, evaluado usando ensayos bioquímicos y funcionales comunes conocidos por los expertos en la materia, y puede almacenarse durante un período de tiempo prolongado sin pérdida de la actividad biológica, por ejemplo, la unión a FcγR.

4. Breve descripción de los dibujos

FIGS. 1 A-B SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS REGIONES CH1, BISAGRA Y Fc DE IgG HUMANA

La figura 1 proporciona las secuencias de aminoácidos de los dominios bisagra (A) y Fc (B) de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas. (Dominio bisagra de IgG1 (SEQ ID NO: 1); dominio bisagra de IgG2 (SEQ ID NO: 2); dominio bisagra de IgG3 (SEQ ID NO: 3); dominio bisagra de IgG4 (SEQ ID NO: 4); dominio Fc de IgG1 (SEQ ID NO: 5); dominio Fc de IgG2 (SEQ ID NO: 6); dominio Fc de IgG3 (SEQ ID NO: 7); dominio Fc de IgG1 (SEQ ID NO: 8)). Los restos de aminoácidos que se muestran en las FIG. 1A y 1B se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat EU. Las secuencias isotipo se alinean con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último resto de cisteína de las respectivas regiones bisagra, lo que forma los enlaces S-S entre las cadenas pesadas, en las mismas posiciones. Para la Figura 1B, los restos del dominio CH2 están indicados por +, mientras que los restos del dominio CH3 están indicados por ~.

FIG. 2 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS DE DIACUERPOS BIFUNCIONALES COVALENTES

Los polipéptidos de un diacuerpo bifuncional covalente consisten en un dominio VL de anticuerpo y un dominio VH de anticuerpo separados por un enlazador peptídico corto. El enlazador de 8 restos de aminoácido evita el autoensamblaje de una sola cadena polipeptídica en construcciones scFv, y, en cambio, las interacciones entre los dominios VL y VH de diferentes cadenas polipeptídicas predominantes. Se crearon 4 construcciones (cada construcción se describe desde el extremo amino-terminal ("n"), lado izquierdo de la construcción, hasta el extremo carboxi-terminal ("c"), lado derecho de la figura): construcción (1) (SEQ ID NO: 9) compuesta de, n-el dominio VL Hu2B6 – enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8 – y una secuencia C-terminal (LGGC)- c; construcción (2) (SEQ ID NO: 11) que se compone de n-el dominio VL Hu3G8 - enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 – y una secuencia C-terminal (LGGC)-c; construcción (3) (SEQ ID NO: 12) que se compone de n-el dominio VL Hu3G8 - enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8 – y una secuencia C-terminal (LGGC)-c; construcción (4) (SEQ ID NO: 13) que se compone de n-el dominio VL Hu2B6 - enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 – y una secuencia C-terminal (LGGC)-c.

FIG. 3 ANÁLISIS DE SDS-PAGE DE LOS DIACUERPOS PURIFICADOS POR AFINIDAD

Se sometieron diacuerpos purificados por afinidad a análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras (carriles 1-3) o no reductoras (carriles 4-6). Se indican los pesos moleculares aproximados del patrón (entre los carriles 3 y 4). Carriles 1 y 4, CMD h3G8; Carriles 2 y 5, CMD h2B6; y Carriles 3 y 6, CBD h2B6-h3G8.

FIG. 4 A-B ANÁLISIS DE SEC DE DIACUERPOS PURIFICADOS POR AFINIDAD

Se sometieron diacuerpos purificados por afinidad a análisis de SEC. (A) Perfil de elución de patrones conocidos: IgG de longitud completa (~150 kDa), fragmento Fab de IgG (~50 kDa) y scFv (~30 kDa); (B) Perfil de elución de CMD h2b6, CMD h3G8 y CBD h2B6-h3G8.

FIG. 5 UNIÓN de CBD h2B6-h3G8 A LAS PROTEÍNAS sCD32B Y sCD16A

Se ensayó la unión del CBD h2B6-h3G8 a las proteínas sCD32B y sCD16A en un análisis de ELISA de tipo sándwich. Se usó sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado con HRP. CMD h3G8, que se une CD16A, se usó como control.

FIG. 6 A-C ANÁLISIS DE BIACORE DE LA UNIÓN DE DIACUERPO A sCD16A, sCD32B Y sCD32B

La unión de CBD h2B6-h3G8, CMD h2B6 y CMD h3G8 a sCD16A, sCD32B y sCD32A (control negativo) se ensayó mediante análisis de SPR. También se ensayó como control scFv h3G8. (A) Unión a sCD16; (B) unión a sCD32B y (C) unión a sCD32A. Los diacuerpos se inyectaron a una concentración de 100 nM y el fragmento scFv a una concentración de 200 mM, sobre las superficies receptoras a un caudal de 50 ml/min durante 60 s.

FIG. 7 A-C ANÁLISIS DE BIACORE DE LA UNIÓN DE DIACUERPO A sCD16A y sCD32B

La unión de CBD h2B6-h3G8, CMD h2B6 y CMD h3G8 a sCD16A y sCD32B se ensayó mediante análisis de SPR. El fragmento scFv h3G8 también se ensayó como control. (A) Unión de CMD h3G8 a sCD16A; (B) unión de CBD h2B6-h3G8 a sCD16A; (C) unión de scFv h3G8 a sCD16A; (D) unión de CMD h2B6 a sCD32B; y (E) unión de CBD h2B6-h3G8 a sCD32B. Los diacuerpos se inyectaron a concentraciones de 6,25-200 nM sobre superficies receptoras a un caudal de 70 ml/min durante 180 s.

FIG. 8 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA INTERACCIÓN DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE CONTIENEN LOS DOMINIOS VL Y VH PARA FORMAR UNA MOLÉCULA DE DIACUERPO BIESPECÍFICA COVALENTE

NH_2 y COOH representan los grupos amino-terminal y carboxi-terminal, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa el resto de cisteína C-terminal en cada cadena polipeptídica. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas y discontinuas son para distinguir entre las dos cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las partes enlazadoras de dichas cadenas. Fv h2B6 y Fv h3G8 indican un sitio de unión a epítopo específico para CD32B y CD16, respectivamente.

FIG. 9 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE CONTIENEN DOMINIOS Fc DE LOS DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES

Representación de las construcciones polipeptídicas de las moléculas de diacuerpo de la divulgación (cada construcción se describe desde el extremo amino-terminal ("n"), lado izquierdo de la construcción, hasta el extremo carboxi-terminal ("c"), lado derecho de la figura). Construcción (5) (SEQ ID NO: 14) compuesta de, n-dominio VL Hu2B6 – un primer enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8 – un segundo enlazador (LGGC)- y un dominio Fc C-terminal de IgG1 humana-c; construcción (6) (SEQ ID NO: 15) que se compone de n-el dominio VL Hu3G8 - enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de

Hu2B6 – y el segundo enlazador (LGGC)- y un dominio Fc C-terminal de IgG1 humana-c; construcción (7) (SEQ ID NO: 16) que se compone de n-el dominio VL Hu2B6 – un primer enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8 – y una secuencia C-terminal (LGGCFNRGEC) (SEQ ID NO: 17)-c; construcción (8) (SEQ ID NO: 18) que se compone de n-el dominio VL Hu3G8 – enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 – y un segundo enlazador (LGGC)- y un dominio bisagra/Fc C-terminal de IgG1 humana (con sustitución de aminoácido A215V)-c.

FIG. 10 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS Fc A sCD32B Y sCD16A

Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc a sCD32B y sCD16A en un ensayo ELISA de tipo sándwich. Los diacuerpos ensayados se produjeron mediante 3 sistemas de expresión recombinante: cotransfección de pMGX669 y pMGX674, que expresan las construcciones 1 y 6, respectivamente; cotransfección de pMGX667 y pMGX676, que expresan las construcciones 2 y 5, respectivamente; y cotransfección de pMGX674 y pMGX676, que expresan las construcciones 5 y 6, respectivamente. Se usó la proteína sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado a HRP.

FIG. 11 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA INTERACCIÓN DE LAS DOS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE COMPRENDEN CADA UNA UN DOMINIO Fc PARA FORMAR UN DIACUERPO BIVALENTE, COVALENTE

NH_2 y COOH representan los grupos amino-terminal y carboxi-terminal, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa el al menos un enlace disulfuro entre un resto de cisteína de la segunda secuencia enlazadora de cada cadena polipeptídica. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas y discontinuas son para distinguir entre las dos cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las primeras partes enlazadoras de dichas cadenas. CH2 y CH3 representan los dominios constantes CH2 y CH3 de un dominio Fc. Fv h2B6 y Fv h3G8 indican un sitio de unión a epítopo específico para CD32B y CD16, respectivamente.

FIG. 12 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS BISAGRA/Fc A sCD32B Y sCD16A

Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc a sCD32B y sCD16A en un ensayo ELISA de tipo sándwich. Los diacuerpos ensayados se produjeron mediante 4 sistemas de expresión recombinante: cotransfección de pMGX669 + pMGX674, que expresan las construcciones 1 y 6, respectivamente; cotransfección de pMGX669 + pMGX678, que expresan las construcciones 2 y 8, respectivamente; cotransfección de pMGX677 + pMGX674, que expresan las construcciones 7 y 6, respectivamente; y cotransfección de pMGX677 + pMGX678, que expresan las construcciones 7 y 8, respectivamente. Se usó la proteína sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado a HRP.

FIG. 13 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA INTERACCIÓN DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS PARA FORMAR UNA MOLÉCULA DE DIACUERPO TETRAMÉRICA

NH_2 y COOH representan los grupos amino-terminal y carboxi-terminal, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa el al menos un enlace disulfuro entre un resto de cisteína en la segunda secuencia enlazadora de la cadena polipeptídica, 'más pesada', que porta el dominio Fc y un resto de cisteína en la secuencia C-terminal de la cadena de polipéptido "más ligera" que no porta el dominio Fc. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas y discontinuas son para distinguir entre cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las primeras partes enlazadoras de las cadenas más pesadas o el enlazador de dichas cadenas más ligeras. CH2 y CH3 representan los dominios constantes CH2 y CH3 de un dominio Fc. Fv h2B6 y Fv h3G8 indican un sitio de unión a epítopo específico para CD32B y CD16, respectivamente.

FIG. 14 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE CONTIENEN DOMINIOS Fc QUE FORMAN DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES

Representación de construcciones polipeptídicos que forman las moléculas de diacuerpo de la divulgación (cada construcción se describe desde el extremo amino-terminal ("n"), lado izquierdo de la construcción, hasta el extremo carboxi-terminal ("c"), lado derecho de la figura). Construcción (9) (SEQ ID NO: 19) compuesta den-un dominio bisagra/Fc de la IgG1 humana – el dominio VL Hu3G8 – enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 – enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10))- y una secuencia LGGC C-terminal-c; construcción (10) (SEQ ID NO: 20) compuesto de n-un dominio Fc de la IgG1 humana – el dominio VL Hu3G8 – enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 - enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10))- y una secuencia LGGC C-terminal-c; construcción (11) (SEQ ID NO: 21) compuesto de n-el dominio VL Hu2B6 (G105C) - enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8 – y un dominio bisagra/Fc C-terminal de IgG1 humana con sustitución de aminoácido A215V; construcción (12) (SEQ ID NO: 22) compuesto de n-el dominio VL Hu3G8 - enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 (G44C) – y una secuencia FNRGEC C-terminal (SEQ ID NO: 23)-c.

FIG. 15 A-B ANÁLISIS DE SDS-PAGE Y DE TRANSFERENCIA WESTERN DE LA AFINIDAD DE DIACUERPOS TETRAMÉRICOS

Los diacuerpos producidos mediante sistemas de expresión recombinante cotransfectados con vectores que expresan las construcciones 10 y 1, las construcciones 9 y 1, y las construcciones 11 y 12 se sometieron a análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras (A) y análisis de transferencia Western usando H+L anti-IgG1 humana de cabra como sonda (B). Las proteínas del gel SDS-PAGE se visualizaron con tinción con Simply Blue Safestain (Invitrogen). En ambos paneles A y B, las moléculas de diacuerpo que comprenden las

construcciones 10 y 1, las construcciones 9 y 1, y las construcciones 11 y 12A están en las carriles 1, 2 y 3, respectivamente.

FIG. 16 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS Fc Y ENLACES DISULFURO ENTRE CADENAS MODIFICADOS POR INGENIERÍA A sCD32B Y sCD16A

Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc y enlaces disulfuro modificados por ingeniería entre las cadenas polipeptídicas 'más ligera' y 'más pesada' a sCD32B y sCD16A en un análisis de ELISA de tipo sándwich. Los diacuerpos ensayados se produjeron mediante 3 sistemas de expresión recombinante: que expresan las construcciones 1 y 10, que expresan las construcciones 1 y 9, y que expresan las construcciones 11 y 12, respectivamente. Se usó la proteína sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado a HRP. Se usó como control la unión de h3G8.

FIG. 17 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PRECURSOR DE POLIPROTEÍNA DE LA MOLÉCULA DE DIACUERPO Y REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE CONTIENEN LOS DOMINIOS DE CADENA LIGERA LAMBDA Y/O BISAGRA

Representación de las construcciones polipeptídicas que comprenden las moléculas de diacuerpo de la divulgación (cada construcción se describe desde el extremo amino-terminal ("n"), lado izquierdo de la construcción, hasta el extremo carboxi-terminal ("c"), lado derecho de la figura). Construcción (13) (SEQ ID NO: 95) compuesta de, n-dominio VL 3G8 – un primer enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de 2.4G2VH – un segundo enlazador (LGGC)-sitio de reconocimiento de furina (RAKR (SEQ ID NO: 93))-dominio VL de 2.4G2-un tercer enlazador (GGGSGGG (SEQ ID NO: 10)-dominio VH de 3G8- y un dominio LGGC C-terminal; (la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO: 95 se proporciona en SEQ ID NO: 96). Construcción (14) (SEQ ID NO: 97) compuesta de, n-dominio VL 3G8 – un primer enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de 2.4G2VH – un segundo enlazador (LGGC)-sitio de reconocimiento de furina (RAKR (SEQ ID NO: 93))-FMD (proteasa C3 del virus de la fiebre aftosa) dominio VL de 2.4G2-un tercer enlazador (GGGSGGG (SEQ ID NO: 10)-dominio VH de 3G8- y un dominio LGGC C-terminal; (la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO: 97 se proporciona en SEQ ID NO: 98). Construcción (15) (SEQ ID NO: 99) compuesta de, n-dominio VL Hu2B6 – un enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8- y un dominio FNRGEC C-terminal (SEQ ID NO: 23); (la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO: 99 se proporciona en SEQ ID NO: 100). Construcción (16) (SEQ ID NO: 101) compuesta de, n- dominio VL Hu3G8 – un enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6- y un dominio VEPKSC C-terminal (SEQ ID NO: 77); (la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO: 101 se proporciona en SEQ ID NO: 102).

FIG. 18 UNIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE DIACUERPO DERIVADAS DE UNA MOLÉCULA PRECURSORA DE POLIPROTEÍNA A mCD32B Y sCD16A

Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo derivadas de la molécula precursora de poliproteína, construcción 13 (SEQ ID NO: 95) a CD32B murino (mCD32B) y CD16A soluble (sCD16A) en un análisis de ELISA de tipo sándwich. Se usó mCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugada a biotina.

FIG. 19 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS DE CADENA LAMBDA Y/O BISAGRA A sCD32B Y sCD16A

Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios derivados del extremo C-terminal de cadena ligera lambda humana y/o el dominio bisagra de la IgG a sCD32B y sCD16A, y se comparó con el diacuerpo que comprende las construcciones 1 y 2 (FIG. 5) en un análisis de ELISA de tipo sándwich. Los diacuerpos ensayados se produjeron mediante el sistema de expresión recombinante que expresaba las construcciones 15 y 16 (SEQ ID NO: 99 y SEQ ID NO: 101, respectivamente). Se usó sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado a HRP. Las barras con cuadros pequeños representan la combinación de las construcciones 15/16, mientras que las barras con cuadros grandes representan la combinación de las construcciones 1/2.

FIG. 20 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE DART 2B6/4420 UNIDO A CD32B UBICADO EN LA SUPERFICIE DE UNA CÉLULA Y UNA MOLÉCULA CONJUGADA A FLUORESCEÍNA

El diagrama muestra la flexibilidad del brazo anti-fluoresceína "adaptador universal" de DART, así como la posibilidad de sustituir el brazo 2B6 con otras especificidades. Las regiones V se muestran como cuadros, Los enlazadores GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) se muestran como líneas, el enlace disulfuro se muestra conectando las dos cadenas. Los constituyentes de una cadena se muestran en azul, mientras que el otro es de color rosa. N, extremo amino-terminal; C, extremo carboxi-terminal; FL, fluoresceína, VL, región variable de cadena ligera; VH, región variable de cadena pesada.

FIG. 21 (PANELES A Y B) EL DART 2B6/4420 SE UNE ESPECÍFICAMENTE A MOLÉCULAS CONJUGADAS A FLUORESCEÍNA Y PUEDE UNIRSE SIMULTÁNEAMENTE A CD32B.

(A) Se unieron 2B6/4420 o 2B6/3G8 a placas para ELISA recubiertas con proteína FITC-S. La unión y función del brazo 2B6 se detectaron mediante la unión de CD32B soluble, seguido de un anticuerpo específico para CD32B y un anticuerpo de detección secundario conjugado a HRP. (B) 2B6/4420 o 2B6/3G8 se unieron a placas para ELISA recubiertas con HuIgG o FITC-HuIgG (conjugadas a fluoresceína). Se detectó la unión mediante la unión con un suero policlonal específico para Fv 2B6 seguido de un anticuerpo secundario conjugado a HRP.

FIG. 22 (PANELES A Y B) ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS B PURIFICADOS USANDO ANTICUERPOS ANTI-CD79B HUMANOS.

Se activaron linfocitos B purificados usando concentraciones crecientes de los anticuerpos anti-CD79b humano conjugados a FITC, CB3.1-FITC (A) o CB3.2-FITC (B) y 50 µg/ml del fragmento $F(ab')_2$ de Fc de IgG GAM

específico (eje x). Se activaron linfocitos B en presencia de PBS (barras blancas) o 5 µg/ml de αFITCαCD32BDART (barras negras) o αCD16αCD32BDART (barras grises). Se realizaron las reacciones por triplicado y se calcularon las desviaciones típicas.

FIG. 23 (PANELES A Y B) ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS B PURIFICADOS

Se activaron linfocitos B purificados derivados de un segundo donante sano como se describe en la FIG. 22, Panel B. El índice de proliferación se midió en las células activadas en presencia del anticuerpo anti-CD79b conjugado a FITC, CB3.2-FITC (A) y se comparó con el índice de proliferación de células activadas en presencia del anticuerpo CB3.2 no marcado (B). FIG. 24 (Paneles superior e inferior) AGOTAMIENTO DE LINFOCITOS B MURINOS *IN VIVO* EN RATONES TRANSGÉNICOS HCD16A/B USANDO MGD261 Se inyectaron a ratones C57B1/6 mCD32-/-hCD16 A+, C57B1/6 mCD32-/- hCD32B+ y ratones C57B1/6 mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+ de la colonia de reproducción MacroGenics por vía IV en los días 0, 3, 7, 10, 14 y 17 MGD261 (10, 3, 1 o 0,3 mg/kg), o un anticuerpo irrelevante (hE16 10 mg/kg). Se recogió la sangre en los días -19 (antes de la extracción de sangre), 4, 11, 18, 25 y 32 para el análisis de FACS. Tres veces a la semana se registró el estado de salud y la actividad de los animales. Panel superior: h2B6-3G8 y mAb WNV; Panel inferior: ratones h2B6-3G8, -hCD16A o -hCD32B y ratones mAb WNV -hCD16A o - hCD32B.

FIG. 25 AGOTAMIENTO DE LINFOCITOS B MURINOS *IN VIVO* EN RATONES TRANSGÉNICOS HCD16A/B USANDO DB 2.4G2-3G8 Se inyectaron a ratones C57B1/6 mCD16-/-, mCD16-/- hCD16A+, mCD16-/- hCD16B+ y mCD16-/- hCD16A+ hCD16B+ de la colonia de reproducción MacroGenics por vía IP en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 el DB 2.4G2-3G8 (75 ug/ratón) o PBS. Se recogió la sangre en los días -10 (antes de la extracción de sangre), 4, 11 y 18 para el análisis de FACS. Tres veces a la semana se registró el estado de salud y la actividad de los animales.

FIG. 26 DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-TUMORAL DE MGD261 USANDO UN MODELO INTRAVENOSO (IV) DE LA LÍNEA DE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS RAJI.

Se inyectó a ratones C57B1/6 mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/- de doce-veinte semanas de edad de la colonia de reproducción MacroGenics por vía IV en el día 0 $5x10^6$ células Raji. En los días 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 y 30 los ratones también fueron tratados por vía intraperitoneal (IP) con 250, 25 o 2,5 µg de MGD261 o con PBS (control negativo). Después se observó a los ratones a diario y se documentó el peso corporal dos veces a la semana. Los ratones que desarrollaron parálisis de las patas posteriores fueron sacrificados.

FIG. 27 EXPRESIÓN DE DART EN HOSPEDADOR NO MAMÍFERO

Se transformaron células BL21DE3 (Novagen) con el plásmido pET25b(+) *T7-lac+* 3G8/3G8 y se usó una colonia resistente a la ampicilina para sembrar un caldo de cultivo. Cuando el cultivo alcanzó las 0,5 unidades de DO600, se añadió IPTG 0,5 mM para inducir la expresión. El cultivo se desarrolló a 30 °C durante 2 horas y se recogió medio libre de células.

FIG. 28 ELISA DE DART

Se realizaron ELISA de unión a DART h3G8-h3G8 usando placas Maxisorp de 96 pocillos. Tras la reacción, se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo del sustrato TMB. Tras 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H_2SO_4 al 1 %. Se leyó la DO450 nm usando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura usando el software GraphPadPrism 3.03.

FIG. 29 MUERTE DE LINFOCITOS B HUMANOS INDUCIDA POR DART

Se incubaron células PBMC humanas durante la noche con las moléculas indicadas. Se ensayó la apoptosis mediante análisis de FACS como el porcentaje de la población PI+anexina-V+ de linfocitos B (linfocitos CD20+) en la población total no regulada por FSC/SSC.

FIG. 30 CONSTRUCCIONES DE DART 8B5-CB3.1

Se produjeron múltiples construcciones de DART 8B5-CB3.1 para ilustrar la presente divulgación. Las construcciones 5 y 6, o 6 y 7, u 8 y 9, o 9 y 10, los plásmidos de expresión codificados se cotransfectaron en células HEK-293 para expresar el DART 8B5-CB3.1 con o sin marcador anti-flag usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). El medio condicionado se recogió cada tres días tres veces. El medio condicionado se purificó luego usando la columna por afinidad de CD32B.

FIG. 31 ELISA DE DART 8B5-CB3.1

Se realizaron ELISA de competencia de DART 8B5-CB3.1/ch8B5 usando placas Maxisorp de 96 pocillos. Tras la reacción, se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo del sustrato TMB. Tras 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H_2SO_4 al 1 %. Se leyó la DO450 nm usando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura usando el software GraphPadPrism 3.03.

FIG. 32 DEMOSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DE DART TETRAVALENTE

Se ilustra la estructura general de una especie de DART producida mediante el ensamblaje de cuatro cadenas polipeptídicas. Los cuatro dominios de unión al antígeno del DART de tipo Ig se muestran como elipses rayadas y de color gris oscuro.

FIG. 33 DART TETRAVALENTE DE TIPO Ig

Se proporciona un esquema de los sitios de unión a epítopo de un DART tetravalente de tipo Ig.

FIG. 34 ELISA DE UNIÓN DE mCD32-hCD16A

Se proporcionan los resultados de ELISA que demuestran que las especies de DART tetravalentes de tipo Ig del Ejemplo 6.10 se unen a antígeno con mayor afinidad que el anticuerpo de control (mAb ch-mCD32) u otras especies de DART.

FIG. 35 DEMOSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS MOLÉCULAS DE DART de tipo Ig

Se proporciona un esquema de las moléculas de DART de tipo Ig. La especificidad se indica mediante regiones sombreadas, con un patrón o de color blanco, las regiones constantes se indican en negro y los enlaces disulfuro se indican mediante líneas negras punteadas. Los extremos N-terminales de todas las cadenas de proteína están orientados hacia la parte superior de la figura, mientras que los extremos C-terminales de todas las cadenas de proteína están orientados hacia la parte inferior de la figura. Las ilustraciones A-E son biespecíficas y las ilustraciones F-J son triespecíficas. Las ilustraciones A y E son tetravalentes. Las ilustraciones B, C, F, I y J son hexavalentes. Las ilustraciones D, G y H son octavalentes. Para ver los detalles de las descripciones de cada uno de los dominios, véanse las Figuras 1, 2, 9, 14 y 17, y el apartado 3.1.

FIG. 36 CAPACIDAD DE UNIÓN DEL DIACUERPO BIESPECÍFICO HU2B6 4.5-HU3G8 5.1

La figura 36 muestra la capacidad del diacuerpo biespecífico Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1 (cuadrados) para unirse a CD32b y CD16a en relación con los diacuerpos Hu2B6 4.5 o Hu3G8 5.1 (triángulos).

FIG. 37 ESQUEMA DE LOS DERIVADOS DE DART DE BUCLE E Y BUCLE K

La figura 37 ilustra la conformación general de los derivados DART del bucle E y el bucle K.

FIG. 38 DISPOSICIÓN DE HÉLICE DE LOS SEPARADORES PREFERIDOS DE BUCLE E Y BUCLE K

La figura 38 muestra la disposición helicoidal de la secuencia preferida de "bucle E" $(EVAALEK)_4$ (SEQ ID NO: 299) y secuencia preferida de "bucle K" (KVAALKE) 4 (SEQ ID NO: 300).

FIG. 39 DERIVADOS DE DART QUE CONTIENEN Fc DE BUCLE E Y BUCLE K

La figura 39 ilustra las diferentes especies de derivados de DART que contienen Fc de bucle E y bucle K que se pueden formar a través del intercambio de cadenas.

FIG. 40 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑOS DE DERIVADOS DE BUCLE E Y/O BUCLE K Y DERIVADOS QUE CONTIENEN Fc DE BUCLE E Y/O BUCLE K DE LOS DART h2B6YAhCB3

La figura 40 muestra los resultados de la cromatografía de exclusión por tamaños en derivados de bucle E y/o bucle K y derivados de E y/o bucle K que contienen Fc de los DART h2B6YAhCB3. Se analizaron cuatro especies de dichas moléculas; todas tenían un bucle E y un bucle K: EK (sin región Fc), 2,1 mg; EFc/K (Fc ligado a bucle E), 2,7 mg; E/KFc (Fc ligado a bucle K), 1,8 mg; EFc/KFc (Fc ligado al bucle K y el bucle E del mismo DART), 2,0 mg

FIG. 41 ESTRUCTURA DE MOLECULAS DE DÍMERO PRODUCIDAS

La figura 41 muestra la posible estructura de la molécula dimérica producida identificada en el cromatograma de exclusión por tamaño de la figura 40.

FIG. 42 ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA DE LOS DERIVADOS DE BUCLE E Y/O BUCLE K Y LOS DERIVADOS DE BUCLE E Y/O BUCLE K QUE CONTIENEN Fc DE LOS DART h2B6YAhCB3 La figura 42 muestra los resultados de un análisis por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión por tamaños (figura 40) de los derivados de bucle E y/o bucle K y los derivados de bucle E y/o bucle K que contienen Fc de los DART h2B6YAhCB3. Carriles flanqueantes: controles de marcadores moleculares; Carril 1: EK (sin región Fc); Carril 2: EFc/K, fracción agregada; Carril 3: EFc/K, fracción de monómero; Carril 4: E/KFc, fracción agregada; Carril 5: E/KFc, fracción de monómero; Carril 6: EFc/KFc, fracción agregada; Carril 7: EFc/KFc, fracción de dímero; Carril 8: EFc/KFc, fracción de monómero.

FIG. 43 ANÁLISIS DE ELISA DE UNIÓN BISPECÍFICA

La figura 43 muestra el resultado de un ELISA de unión biespecífica que compara los derivados DART h2B6YAhCB3 de bucle E/bucle K que contienen Fc (EFc/K o E/KFc), DART h2B6YAhCB3, de control y un derivado de DART h2B6YAhCB3 EFc/KFc.

FIG. 44 CAPACIDAD DE LOS DERIVADOS DE BUCLE E Y/O BUCLE K Y DE LOS DERIVADOS DE BUCLE E Y/O BUCLE K QUE CONTIENEN Fc DE LOS DART h2B6YAhCB3 PARA INHIBIR LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T

La figura 44 muestra la capacidad de los derivados de bucle E y/o bucle K y de los derivados de bucle E y/o bucle K que contienen Fc de los DART h2B6YAhCB3 para inhibir la proliferación de linfocitos T.

FIG. 45 ABD-DART hCD16-hCD32B

La figura 45 muestra un esquema de una molécula de anticuerpo recombinante, ABD-DART hCD16-hCD32B compuesta del dominio ABD3 de la proteína G estreptocócica fusionado a un DART biespecífico recombinante que es inmunorreactivo con los antígenos hCD16 y hCD32B.

FIG. 46A/46B AFINIDAD DE UNIÓN DE ABD-DART hCD16-hCD32B USANDO ELISA ESPECÍFICO DUAL

Las placas de ELISA se recubrieron con antígeno CD16 (figura 46A) o seroalbúmina humana (figura 46B) a una concentración de 2 µg/ml. Se unieron concentraciones variables de ABD-DART hCD16-hCD32B (■) y control de DART hCD16-hCD32B (O) que comenzaban con 2 µg/ml. Se añadió antígeno sCD32B biotinilado a la placa seguido de estreptavidina conjugada con HRP para la detección.

FIG. 47 CITOTOXICIDAD MEDIADA POR PBMC DE PROTEÍNAS DART

Citotoxicidad mediada por PBMC de proteínas DART. Se llevaron a cabo ensayos de ADCC usando líneas de linfocitos B humanos, Daudi como células diana incubadas con PBMC como células efectoras. Los ensayos individuales se efectuaron por triplicado a una relación de efector a diana de 20:1 y una titulación de anticuerpos: DART hCD16A-hCD32B (●) y ABD DART hCD16A-hCD32B (■). La citotoxicidad mediada por células se midió mediante un ensayo de liberación de LDH. La curva inferior a 10° es ABD DART hCD16A-hCD32B (■).

FIG. 48 PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS MEJORADAS DE ABD DART hCD16-hCD32B EN RATONES C57B1/6

Se inyectó a ratones (n=3) una sola inyección intravenosa de (A) ABD DART hCD16-hCD32B (●) y (B) DART hCD16-hCD32B (A) a 5 mg/kg. Se recogió suero de ratón en diversos puntos de tiempo y se cuantificaron las

concentraciones de proteínas en suero mediante ELISA. Los cálculos farmacocinéticos se realizaron utilizando WinNonlin Professional 5.1.

FIG. 49A-E ACTIVIDAD DE DART HER2 x TCRb EN UN PANEL DE LÍNEAS CELULARES CON BAJA EXPRESIÓN DE HER2

Las moléculas de DART que tienen dominios de unión al receptor de linfocitos T y Her2 (TCR) se probaron para determinar su capacidad para mediar la citotoxicidad en múltiples líneas celulares de cáncer de colon y cáncer de vejiga que se habían caracterizado previamente por presentar bajos niveles de expresión de HER2 (y por lo tanto son refractarias al tratamiento con el anticuerpo anti-Her2/neu, Herceptin®. Las líneas celulares de cáncer de mama analizadas son ZR75-1 (HER2 2+) (FIG. 49A), MCF-7 (HER2 1+) (FIG. 49B) y MDA-MB468 (HER2-ve) (FIG. 49C). Las líneas celulares no de cáncer de mama analizadas son HT-29 (línea celular de cáncer de colon) (FIG. 49D) y SW780 (línea celular de cáncer de vejiga) (FIG. 49E).

5. Descripción de las realizaciones preferidas

Cada cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo contiene un dominio V_L y un dominio V_H, que se unen de manera covalente de modo que se impide el autoensamblaje de los dominios. La interacción de dos de las cadenas polipeptídicas producirá dos apareamientos V_L-V_H, formando dos sitios de unión a epítopo, es decir, una molécula bivalente. Ni el dominio V_H ni el V_L están restringidos a una posición dentro de la cadena polipeptídica, es decir, restringidos al extremo amino (N)-terminal o al extremo carboxi (C)-terminal, ni los dominios están restringidos a sus posiciones relativas entre sí, es decir, el dominio V_L puede ser N-terminal respecto del dominio V_H y viceversa. La única restricción es que haya una cadena polipeptídica complementaria disponible para formar el diacuerpo funcional. Cuando los dominios V_L y V_H se derivan del mismo anticuerpo, las dos cadenas polipeptídicas complementarias pueden ser idénticas. Por ejemplo, cuando los dominios de unión se derivan de un anticuerpo específico para el epítopo A (es decir, el dominio de unión se forma a partir de una interacción VL_A-VH_A), cada polipéptido comprenderá un VH_A y un VL_A. La homodimerización de dos cadenas polipeptídicas de anticuerpo producirá la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_A, dando lugar a un anticuerpo monoespecífico bivalente. Cuando los dominios VL y VH se derivan de anticuerpos específicos para diferentes antígenos, la formación de un diacuerpo biespecífico funcional requiere la interacción de dos cadenas polipeptídicas diferentes, es decir, la formación de un heterodímero. Por ejemplo, para un diacuerpo biespecífico, una cadena polipeptídica comprenderá un dominio VL_A y un VL_B; la homodimerización de dicha cadena dará lugar a la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_B, bien de no unión o de unión impredecible. Por el contrario, cuando dos cadenas polipeptídicas diferentes tienen libertad para interaccionar, por ejemplo, en un sistema de expresión recombinante, comprendiendo una un VL_A y un VH_B y comprendiendo la otra un VL_B y un VH_A, se formaran dos sitios de unión distintos: VL_A-VH_A y VL_b-VH_b. Para todos los pares de cadenas polipeptídicas de diacuerpos, la posibilidad de desalineamiento o la ausencia de unión de las dos cadenas es una posibilidad, es decir, la interacción de los dominios VL-VL o VH-VH; sin embargo, la purificación de los diacuerpos funcionales se controla fácilmente basándose en la inmunoespecificidad del sitio de unión adecuadamente dimerizado usando cualquier método basado en la afinidad conocido en la técnica o ilustrado en el presente documento, por ejemplo, cromatografía de afinidad.

En otras realizaciones, una o más de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprende un dominio Fc. Los dominios Fc de las cadenas polipeptídicas de las moléculas de diacuerpo preferentemente se dimerizan, dando lugar a la formación de una molécula de diacuerpo que presenta propiedades de tipo inmunoglobulina, por ejemplo, interacciones Fc-FcγR. Los diacuerpos que comprenden Fc pueden ser dímeros, por ejemplo, compuestos por dos cadenas polipeptídicas, que comprenden cada una un dominio VH, un dominio VL y un dominio Fc. La dimerización de dichas cadenas polipeptídicas da lugar a un diacuerpo bivalente que comprende un dominio Fc, aunque con una estructura distinta de la del anticuerpo bivalente no modificado (FIG. 11). Dichas moléculas de diacuerpo presentarán fenotipos modificados con respecto a la inmunoglobulina de tipo silvestre, por ejemplo, semivida en suero modificada, propiedades de unión modificadas, etc. En otras realizaciones, las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc pueden ser tetrámeros. Dichos tetrámeros comprenden dos cadenas polipeptídicas 'más pesadas', es decir, una cadena polipeptídica que comprende un dominio VL, un dominio VH y un dominio Fc, y dos cadenas polipeptídicas 'más ligeras', es decir, cadena polipeptídica que comprende un dominio VL y un dominio VH. Las cadenas más ligeras y más pesadas interactúan para formar un monómero, y dichos monómeros interaccionan a través de sus dominios Fc no apareados para formar una molécula de tipo Ig. Dicho diacuerpo de tipo Ig es tetravalente y puede ser monoespecífico, biespecífico o tetraespecífico.

Los al menos dos sitios de unión de la molécula de diacuerpo pueden reconocer los mismos epítopos o diferentes. Epítopos diferentes pueden ser del mismo antígeno o epítopos de diferentes antígenos. En una realización, los epítopos son de diferentes células. En otra realización, los epítopos son antígenos de superficie celular de la misma célula o del mismo virus. Los sitios de unión a los epítopos pueden reconocer cualquier antígeno frente al que se pueda generar un anticuerpo. Por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, toxinas bacterianas, marcadores de superficie celular, marcadores autoinmunes, proteínas víricas, fármacos, etc. En aspectos particulares, al menos un sitio de unión a epítopo del diacuerpo es específico para un antígeno en una determinada célula, tal como un linfocito B o un linfocito T, una célula fagocítica, un linfocito citolítico natural (NK) o una célula dendrítica.

Cada dominio de la cadena polipeptídica del diacuerpo, es decir, el dominio VL, VH y FC puede estar separado por un enlazador peptídico. El enlazador peptídico puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 aminoácidos. En ciertas

realizaciones, la secuencia enlazadora de aminoácidos es GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) codificada por la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 74).

En determinadas realizaciones, cada cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo se modifica por ingeniería para que comprenda al menos un resto de cisteína que interaccione con un homólogo en al menos un resto de cisteína de una segunda cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo para formar un enlace disulfuro entre cadenas. Dichos enlaces disulfuro entre cadenas servirán para estabilizar la molécula de diacuerpo, mejorando la expresión y recuperación de los sistemas recombinantes, dando lugar a una formulación estable y sistemática, así como a la mejora de la estabilidad del producto aislado y/o purificado *in vivo*. Dicho al menos un resto de cisteína puede introducirse como un solo aminoácido o como parte de una secuencia de aminoácidos mayor, por ejemplo, dominio bisagra, en cualquier parte de la cadena polipeptídica. En una realización específica, dicho al menos un resto de cisteína se modifica por ingeniería para que se encuentre en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos LGGC. En una realización específica, el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica que comprende la molécula de diacuerpo de la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos LGGC. En otra realización, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio bisagra, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 4. En una realización específica, el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo de la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio bisagra de IgG, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica de una molécula de diacuerpo de la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77), que puede codificarse por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 78). En otras realizaciones, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC (SEQ ID NO: 17), que puede codificarse por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 76). En una realización específica, el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica que comprende el diacuerpo de la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC (SEQ ID NO: 17), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 76). En otras realizaciones más, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO: 23), que puede codificarse por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 75). En una realización específica, el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica que comprende el diacuerpo de la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO: 23), que puede codificarse por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 75).

En determinadas realizaciones, la molécula de diacuerpo comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales comprende la secuencia de aminoácidos LGGC y están unidas de manera covalente por un enlace disulfuro entre los restos de cisteína de dichas secuencias LGGC. En otra realización específica, la molécula de diacuerpo comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, una de las cuales comprende la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23), mientras que la otra comprende un dominio bisagra (que contiene al menos un resto de cisteína), en donde dichas al menos dos cadenas polipeptídicas están unidas de manera covalente por un enlace disulfuro entre el resto de cisteína de FNRGEC (SEQ ID NO: 23) y un resto de cisteína en el dominio bisagra. En aspectos particulares, el resto de cisteína responsable del enlace disulfuro ubicado en el dominio bisagra es Cys-128 (según la numeración de acuerdo con el sistema Kabat EU; ubicado en el dominio bisagra de una cadena pesada de IgG intacta no modificada) y el resto de cisteína complementario en la SEQ ID NO: 23 es Cys-214 (según la numeración de acuerdo con el sistema Kabat EU, ubicado en el extremo C-terminal de una cadena ligera de IgG intacta, no modificada) (Elkabetz et al. (2005) "Cysteines In CH1 Underlie Retention Of Unassembled Ig Heavy Chains", J. Biol. Chem. 280:14402-14412). En otras realizaciones más, el al menos un resto de cisteína se modifica por ingeniería para que se encuentre en el extremo N-terminal de la cadena de aminoácidos. En otras realizaciones más, el al menos un resto de cisteína se modifica por ingeniería para que se encuentre en la parte enlazadora de la cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo. En otras realizaciones, el dominio VH o VL se modifica por ingeniería para que comprenda al menos una modificación de aminoácidos respecto al dominio VH o VL precursor, de modo que la modificación de aminoácidos comprenda una sustitución de un aminoácido precursor por cisteína.

La divulgación abarca moléculas de diacuerpo que comprenden un dominio Fc. El dominio Fc o parte del mismo puede derivarse de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina incluyendo, pero sin limitación, IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En las realizaciones preferidas, el dominio Fc (o parte del mismo) se deriva de IgG. En realizaciones específicas, el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o un alotipo de los mismos. En una realización, la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc, dominio Fc que comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 seleccionados de manera independiente a partir de cualquier isotipo de inmunoglobulina (es decir, un dominio Fc que comprende el dominio CH2 derivado de IgG y el dominio CH3 derivado de IgE, o el dominio CH2 derivado de IgG1 y el dominio CH3 derivado de IgG2, etc.). Dicho dominio Fc se puede diseñar en una cadena polipeptídica que comprende la molécula de diacuerpo de la divulgación en cualquier posición con respecto a otros dominios o porciones de dicha cadena polipeptídica (por ejemplo, el dominio Fc puede ser c-terminal para los dominios VL y VH del polipéptido de la cadena; puede ser N-terminal para los dominios VL y VH; o puede ser N-terminal para un dominio y c-terminal para otro (es decir, entre dos dominios de la cadena polipeptídica)).

La presente divulgación también engloba moléculas que comprenden un dominio bisagra. El dominio bisagra puede derivarse de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina, incluyendo IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En las realizaciones

preferidas, el dominio bisagra se deriva de IgG, en el que el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un alotipo de los mismos. Dicho dominio bisagra puede modificarse por ingeniería para dar una cadena polipeptídica que comprenda la molécula de diacuerpo junto con un dominio Fc de modo que la molécula de diacuerpo comprenda un dominio bisagra-Fc. En determinadas realizaciones, el dominio bisagra y Fc se seleccionan independientemente de cualquier isotipo de inmunoglobulina conocido en la técnica o ilustrado en el presente documento. En otras realizaciones, el dominio bisagra y Fc están separados por al menos otro dominio de la cadena polipeptídica, por ejemplo, el dominio VL. El dominio bisagra, u opcionalmente, el dominio bisagra-Fc, pueden modificarse por ingeniería para dar un polipéptido de la divulgación en cualquier posición respecto a otros dominios o partes de la cadena polipeptídica. En determinadas realizaciones, una cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo comprende un dominio bisagra, encontrándose dicho dominio bisagra en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica, en donde dicha cadena polipeptídica no comprende un dominio Fc. En otras realizaciones más, una cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo comprende un dominio bisagra-Fc, encontrándose dicho dominio bisagra-Fc en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica. En otras realizaciones, una cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo comprende un dominio bisagra-Fc, encontrándose dicho dominio bisagra-Fc en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica.

Como se ha analizado anteriormente, la divulgación engloba multímeros de las cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una de sus cadenas polipeptídicas un dominio VH y VL. En determinados aspectos, las cadenas polipeptídicas de los multímeros contienen además un dominio Fc. La dimerización de los dominios Fc conducen a la formación de una molécula de diacuerpo que presenta funcionalidad de tipo inmunoglobulina, es decir, función mediada por Fc (por ejemplo, la interacción Fc-FcγR, unión del complemento, etc.). En determinadas realizaciones, los dominios VL y VH que comprenden cada cadena polipeptídica tienen la misma especificidad, y la molécula de diacuerpo es bivalente y monoespecífica. En otras realizaciones, los dominios VL y VH que comprenden cada cadena polipeptídica tienen diferente especificidad y el diacuerpo es bivalente y biespecífico.

En otras realizaciones más, las moléculas de diacuerpo de la divulgación engloban tetrámeros de las cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una de sus cadenas polipeptídicas un dominio VH y VL. En determinadas realizaciones, dos cadenas polipeptídicas del tetrámero comprenden además un dominio Fc. Por tanto, el tetrámero está se compone de dos cadenas polipeptídicas ‘más pesadas’, que comprenden cada una un dominio VL, un dominio VH y un dominio Fc, y dos cadenas polipeptídicas ‘más ligeras’, que comprenden un dominio VL y VH. La interacción de una cadena más pesada y una más ligera para dar un monómero bivalente acoplado con la dimerización de dichos monómeros a través de los dominios Fc de las cadenas más pesadas dará lugar a la formación de una molécula de tipo inmunoglobulina tetravalente (ilustrada en el Ejemplo 6.2 y el Ejemplo 6.3). En ciertos aspectos, los monómeros son los mismos y la molécula de diacuerpo tetravalente es monoespecífica o biespecífica. En otros aspectos, los monómeros son diferentes y la molécula tetravalente es biespecífica o tetraespecífica.

La formación de una molécula de diacuerpo tetraespecífica como se ha descrito anteriormente requiere la interacción de cuatro cadenas polipeptídicas diferentes. Es difícil lograr dichas interacciones de manera eficaz en un solo sistema de producción recombinante celular, debido a las múltiples variantes de los posibles apareamientos erróneos de las cadenas. Una solución para aumentar la probabilidad de apareamientos erróneos es modificar por ingeniería mutaciones de tipo "botón en ojal" en los pares de cadenas polipeptídicas deseadas. Dichas mutaciones favorecen la heterodimerización frente a la homodimerización. Por ejemplo, con respecto a las interacciones Fc-Fc, una sustitución de aminoácido (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 similar y obligará al dominio mutado a emparejarse con un dominio en el que se haya diseñado una mutación complementaria o acomodativa, es decir, el ‘ojal’ (por ejemplo, una sustitución con glicina). Dichas series de mutaciones pueden modificarse por ingeniería en cualquier par de polipéptidos que comprenda la molécula de diacuerpo, y además, modificarse en cualquier parte 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 de tipo inmunoglobulina, y están englobados en el presente documento (véase, por ejemplo, Ridgway et al. (1996) "Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization", Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library", J. Mol. Biol. 270: 26-35 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).

También se describen moléculas de diacuerpo que comprenden la variante de Fc o dominios variantes de bisagra-Fc (o parte de los mismos), comprendiendo dicho dominio Fc variante al menos una modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) con respecto a un dominio Fc de tipo silvestre o dominio bisagra-Fc comparable (o parte de los mismos). Las moléculas que comprenden dominios Fc variantes o dominios bisagra-Fc (o parte de los mismos) (por ejemplo, anticuerpos) normalmente tienen fenotipos alterados con respecto a moléculas que comprenden dominios Fc de tipo silvestre o dominios bisagra-Fc o porciones de los mismos. El fenotipo variante se puede expresar como semivida en suero modificada, estabilidad modificada, susceptibilidad modificada a enzimas celulares o función efectora modificada según lo determinado en un ensayo dependiente de linfocitos NK o

dependiente de macrófagos. Las variantes del dominio Fc identificadas como modificadoras de la función efectora se desvelan en la solicitud internacional WO04/063351, las publicaciones de solicitudes de patente de los Estados Unidos 2005/0037000 y 2005/0064514, y las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º US2006-0134709 A1, presentada el 10 de noviembre de 2005 y US2006-0177439 A1, presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitudes concurrentes de los inventores.

Los diacuerpos biespecíficos de la divulgación pueden unirse al mismo tiempo a dos epítopos distintos e independientes. En ciertas realizaciones, los epítopos son del mismo antígeno. En otras realizaciones, los epítopos son de antígenos diferentes. En las realizaciones preferidas, al menos un sitio de unión a epítopo es específico para un determinante expresado en una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, CD3, CD16, CD32, CD64, etc.) que se expresan en linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK) u otras células mononucleares. En una realización, la molécula de diacuerpo se une al determinante de células efectoras y también activa dicha célula efectora. En este sentido, las moléculas de diacuerpo de la divulgación pueden exhibir una funcionalidad similar a Ig independientemente de si comprenden además un dominio Fc (por ejemplo, como se ensaya en cualquier ensayo de función efectora conocido en la técnica o ejemplificado en el presente documento (por ejemplo, ensayo de ADCC). En ciertas realizaciones, el diacuerpo biespecífico de la divulgación se une tanto a un antígeno del cáncer en una célula tumoral como a un determinante de células efectoras mientras activa dicha célula. En realizaciones alternativas, el diacuerpo biespecífico o la molécula de diacuerpo de la divulgación pueden inhibir la activación de una diana, por ejemplo, célula efectora, uniéndose simultáneamente y de este modo ligando, un receptor activador e inhibidor en la misma célula (por ejemplo, se une tanto a CD32A como a CD32B, tanto a BCR como a CD32B o tanto a IgERI como a CD32B) como se ha descrito anteriormente (véase, el apartado de Antecedentes). En otro aspecto de dicha realización, el diacuerpo biespecífico puede presentar propiedades antivíricas uniendo simultáneamente dos epítopos neutralizantes en un virus (por ejemplo, epítopos de VRS; epítopos de WNV tales como E16 y E53).

En determinadas realizaciones, las moléculas de diacuerpo biespecíficas de la divulgación ofrecen oportunidades únicas para dirigirse a tipos de células específicas. Por ejemplo, el diacuerpo o la molécula de diacuerpo biespecíficos puede modificarse por ingeniería para comprender una combinación de sitios de unión al epítopo que reconozcan una serie de antígenos únicos frente a un tipo de célula o tejido diana. Adicionalmente, cuando cualquiera o ambos antígenos individuales esté/n normalmente separados en otros tipos de tejido y/o célula, es posible usar dominios de unión de baja afinidad con el fin de construir el diacuerpo o la molécula de diacuerpo. Dichos dominios de unión de baja afinidad serán incapaces de unirse al epítopo o antígeno con suficiente avidez con fines terapéuticos. Sin embargo, cuando están presentes epítopos o antígenos en una sola célula o tejido diana, la avidez del diacuerpo o la molécula de diacuerpo hacia la célula o el tejido, con respecto a la célula o al tejido que expresa solo uno de los antígenos, aumentará de modo que la célula o el tejido pueda seleccionarse como diana de manera eficaz mediante la molécula de diacuerpo. Dicha molécula biespecífica puede presentar una mejor unión a uno o ambos de sus antígenos diana en células que expresen dichos antígenos con respecto a un diacuerpo monoespecífico o un anticuerpo con una especificidad solo hacia uno de los antígenos.

Preferentemente, las propiedades de unión de los diacuerpos de la divulgación se caracterizan mediante ensayos funcionales *in vitro* para determinar la actividad de unión y/o una o más funciones de células efectoras del mediador FcγR (mediadas a través de interacciones Fc-FcγR o mediante la unión inmunoespecífica de una molécula de diacuerpo a un FcγR) (véanse los apartados 5.4.2 y 5.4.3). Las afinidades y las propiedades de unión de las moléculas, por ejemplo, diacuerpos, de la divulgación hacia un FcγR se pueden determinar usando ensayos *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar interacciones entre dominio de unión-antígeno o Fc-FcγR, es decir, la unión específica de un antígeno a un dominio de unión o la unión específica de una región Fc a un FcγR, respectivamente, incluyendo, pero sin limitación, ensayo de ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayo de inmunoprecipitación (véase el apartado 5.4.2). En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la divulgación tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tales como los descritos y desvelados en el presente documento) como aquellos ensayos basados *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye moléculas de la divulgación que no presenten el fenotipo deseado en los ensayos *in vitro*, pero que presenten el fenotipo deseado *in vivo*.

En algunas realizaciones, las moléculas de la divulgación se modifican por ingeniería para que comprendan un patrón de glicosilación modificado o una glicoforma modificada con respecto a la parte comparable de la molécula molde. Las glicoformas modificadas por ingeniería pueden ser útiles para diversos fines, incluyendo, pero sin limitación, mejorar la función efectora. Las glicoformas modificadas por ingeniería se pueden generar mediante cualquier método conocido por un experto en la materia, por ejemplo, usando cepas modificadas por ingeniería o de expresión variable, mediante la expresión conjunta con una o más enzimas, por ejemplo, DI N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT111), mediante la expresión de un diacuerpo de la divulgación en diversos organismos o estirpes celulares de diversos organismos, o modificando el/los hidrato/s de carbono después de que el diacuerpo haya sido expresado y purificado. Los métodos para generar glicoformas modificadas por ingeniería son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, las descritas en Umana et al. (1999) "Engineered Glycoforms Of An Antineuroblastoma IgG1 With Optimized Antibody-Dependent Cellular Cytotoxic Activity", Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies et al. (2001) "Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In Adcc Through Higher Affinity For Fc

Gamma RIII", Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al. (2002) "Lack Of Fucose On Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcgamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity", J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al. (2003) "The Absence Of Fucose But Not The Presence Of Galactose Or Bisecting N-Acetylglucosamine Of Human IgG1 Complex-Type Oligosaccharides Shows The Critical Role Of Enhancing Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity", J Biol Chem 278:3466-3473), documentos US 6,602,684; USSN 10/277.370; USSN 10/113.929; PCTWO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnología Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, NJ); tecnología de ingeniería de glicosilación GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Zúrich, Suiza. Véase, por ejemplo, los documentos WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; Okazaki et al. (2004) "Fucose Depletion From Human IgG1 Oligosaccharide Enhances Binding Enthalpy And Association Rate Between IgG1 And FcGammaRIIIA", JMB, 336: 1239-49.

La divulgación engloba además la incorporación de aminoácidos no naturales para generar los diacuerpos de la divulgación. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la materia, tales como los que usan la maquinaria biosintética natural para permitir la incorporación de aminoácidos no naturales a proteínas, véase, por ejemplo, Wang et al. (2002) "Expanding The Genetic Code", Chem. Comm. 1: 1-11; Wang et al. (2001) "Expanding The Genetic Code Of Escherichia coli", Science, 292: 498-500; van Hest et al. (2001) "Protein-Based Materials", Toward A New Level Of Structural Control", Chem. Comm. 19: 1897-1904. Las estrategias alternativas se centran en las enzimas responsables de la biosíntesis de aminoacil-ARNt, véase, por ejemplo, Tang et al. (2001) "Biosynthesis Of A Highly Stable Coiled-Coil Protein Containing Hexafluoroleucine In An Engineered Bacterial Host", J. Am. Chem. Soc. 123(44): 11089-11090; Kiick et al. (2001) "Identification Of An Expanded Set Of Translationally Active Methionine Analogues In Escherichia coli", FEBS Lett. 502(1-2):25-30.

En algunas realizaciones, la divulgación engloba métodos para modificar un dominio VL, VH o Fc de una molécula de la divulgación mediante la adición o eliminación de un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar el hidrato de carbono de proteínas son bien conocidos en la técnica y están englobados dentro de la divulgación, véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos n.º 6.218.149; documento EP 0 359 096 B1; publicación de los Estados Unidos n.º US 2002/0028486; documento WO 03/035835; publicación de los Estados Unidos n.º 2003/0115614; Patente de los Estados Unidos n.º 6.218.149; Patente de los Estados Unidos n.º 6.472.511.

Las moléculas de diacuerpo de la presente divulgación pueden construirse para que comprendan un dominio que es un ligando de unión para el receptor del grupo de eliminador natural 2D (NKG2D). Dichos ligandos de unión y particularmente aquellos que no se expresan en células normales, incluye la molécula de histocompatibilidad 60 (H60), el producto del gen-1 inducible temprano del ácido retinoico (RAE-1) y el transcrito 1 (MULT1) similar a la proteína de unión a UL16 murino (Raulet D.H. (2003) "Roles Of The NKG2D Immunoreceptor And Its Ligands," Nature Rev. Immunol. 3:781-790; Coudert, J.D. et al. (2005) "Altered NKG2D Function In NK Cells Induced By Chronic Exposure To Altered NKG2D Ligand-Expressing Tumor Cells", Blood 106:1711-1717). Los ligandos adicionales reactivos con NKG2D humano incluyen las moléculas MICA y MICB relacionadas con la cadena de clase I del MHC (Diefenbach, A. et al. (1999) "Natural Killer Cells: Stress Out, Turn On, Tune In," Curr. Biol. 9(22):R851-R8533; Bauer, S. et al. (1999) "Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA", Science 285(5428):727-729; Stephens, H.A. (2001) "MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?", Trends Immunol. 22:378-385.

La secuencia de MICA es la SEQ ID NO: 311:

MGLGPVFLLL AGIFPFAPPG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLTEVH
LDGQPFLRCD RQKCRAKPQG QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL
AHIKDQKEGL HSLQEIRVCE IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETKEW
TMPQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY HAMHADCLQE LRRYLKSGVV
LRRTVPPMVN VTRSEASEGN ITVTCRASGF YPWNITLSWR QDGVSLSHDT
QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICQGEEQRF TCYMEHSGNH STHPVPSGKV
LVLQSHWQTF HVSAVAAAAI FVIIIFYVRC CKKKTSAAEG PELVSLQVLD
QHPVGTSDHR DATQLGFQPL MSDLGSTGST EGA

La secuencia de MICB es la SEQ ID NO: 312:

PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE
DVLGAKTWDT ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGGLHSLQ EIRVCEIHED
SSTRGSRHFY YDGELFLSQN LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM
KTKTHYRAMQ ADCLQKLQLP PMVNVICSEV SEGNITVTCR ASSFYPRNIT
LTWRQDGVSL SHNTQQWGDV LPDGNGTYQT WVATRIRQGE EQRFTCYMEH
SGNHGTHPVP SGKALVLQSQ RTDFPYVSAA MPCFVIIIIL CVPCCKKKTS
AAEGP

Los anticuerpos que se unen específicamente al receptor de linfocitos T incluyen el anticuerpo anti-TCR BMA 031 (Kurrle, R. et al. (1989) "BMA 031 - A TCR-Specific Monoclonal Antibody For Clinical Application", Transplant Proc. 21(1 Pt 1):1017-1019; Nashan, B. et al. (1987) "Fine Specificity Of A Panel Of Antibodies Against The TCR/CD3 Complex," Transplant Proc. 19(5):4270-4272; Shearman, C.W. et al. (1991) "Construction, Expression, And Biologic Activity Of Murine/Human Chimeric Antibodies With Specificity For The Human α/β T Cell", J. Immunol. 146(3):928-935; Shearman, C.W. et al. (1991) "Construction, Expression And Characterization of Humanized Antibodies Directed Against The Human α/β T Cell Receptor", J. Immunol. 147(12):4366-4373). Los anticuerpos que se unen específicamente al receptor NKG2D incluyen KYK-2.0 (Kwong, KY et al. (2008) "Generation, Affinity Maturation, And Characterization Of A Human Anti-Human NKG2D Monoclonal Antibody With Dual Antagonistic And Agonistic Activity", J. Mol. Biol. 384:1143-1156; y el documento PCT/US09/54911).

Mediante el uso de dicho diacuerpo, la célula diana se redirige para que sea una célula que puede unirse a células que presentan el receptor (NKG2D). El receptor NKG2D se expresa en todos los linfocitos citolíticos naturales humanos (y de otros mamíferos)(Bauer, S. et al. (1999) "Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA", Science 285(5428):727-729; Jamieson, A.M. et al. (2002) "The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing", Immunity 17(1):19-29) así como en todos los linfocitos T CD8+ (Groh, V. et al. (2001) "Costimulation Of CD8αβ T Cells By NKG2D Via Engagement By MIC Induced On Virus-Infected Cells", Nat. Immunol. 2(3):255-260; Jamieson, A.M. et al. (2002) "The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing", Immunity 17(1):19-29).

Como alternativa, las moléculas de diacuerpo de la presente divulgación pueden construirse para que comprendan un dominio que es un ligando de unión para el receptor de linfocitos T ("TCR"). El TCR se expresa de forma nativa por los linfocitos T CD4+ o CD8+ y permite que dichas células reconozcan los péptidos antigénicos que están unidos y presentados por las proteínas de MHC de clase I o clase II de las células presentadoras de antígeno. El reconocimiento de un complejo de pMHC (péptido-MHC) por un TCR inicia la propagación de una respuesta inmunitaria celular que da lugar a la producción de citocinas y a la lisis de la célula presentadora de antígenos (véase, por ejemplo, Armstrong, K.M. et al. (2008) "Conformational Changes And Flexibility In T-Cell Receptor Recognition Of Peptide-MHC Complexes," Biochem. J. 415(Pt 2): 183-196; Willemsen, R. (2008) "Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T-Cell Epitopes For Adoptive T-Cell Therapy", Cytometry A. 73(11):1093-1099; Beier, K.C. et al. (2007) "Master Switches Of T-Cell Activation And Differentiation", Eur. Respir. J. 29:804-812; Mallone, R. et al. (2005) "Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring And Intervention In Autoimmune Diabetes", Am. J. Ther. 12(6):534-550).

Mediante la construcción de dichas moléculas de diacuerpo para que comprendan adicionalmente un dominio de unión a epítopo capaz de unirse a, por ejemplo, un receptor presente en la superficie de una célula diana, dichas moléculas de diacuerpo serán moléculas DART y, por lo tanto, serán capaces de unirse a las células diana y de este modo harán que las células diana muestren el ligando de unión para el receptor 2D del grupo de eliminador natural (NKG2D) o para el TCR (el que esté presente en el diacuerpo unido a la célula diana (véase, por ejemplo, Germain, C. et al. (2008) "Redirecting NK Cells Mediated Tumor Cell Lysis By A New Recombinant Bifunctional Protein", Prot. Engineer. Design Selection 21(11):665-672).

Dichos diacuerpos pueden usarse para redireccionar cualquier célula diana deseada a una célula que sea un objetivo de la lisis celular mediada por células NK o la citotoxicidad mediada por linfocitos T. En una realización, el dominio de unión a epítopo del diacuerpo capaz de unirse a un receptor presente en la superficie de una célula diana es un epítopo que se une a un antígeno asociado a tumor para redirigir dichas células cancerosas a sustratos para la lisis celular mediada por células NK o citotoxicidad mediada por linfocitos T. De particular interés es un antígeno asociado a un tumor que es un antígeno del cáncer de mama, un antígeno del cáncer de ovario, un antígeno del cáncer de próstata, un antígeno de cáncer de cuello de útero, un antígeno de carcinoma pancreático, un antígeno de cáncer de pulmón, un antígeno de cáncer de vejiga, un antígeno de cáncer de colon, un antígeno de cáncer testicular, un antígeno del cáncer de glioblastoma, un antígeno asociado con una neoplasia maligna de linfocitos B, un antígeno asociado con mieloma múltiple, un antígeno asociado con el linfoma no Hodgkin o un antígeno asociado con leucemia linfocítica crónica.

Los antígenos asociados a tumores adecuados para dicho uso incluyen A33 (un antígeno de carcinoma colorrectal; Almqvist, Y. 2006, Nucl Med Biol. Nov;33(8):991-998); B1 (Egloff, A.M. et al. 2006, Cancer Res. 66(1):6-9); BAGE (Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); beta-catenina(Prange W. et al. 2003 J Pathol. 201(2):250-9); CA125 (Bast, R.C. Jr. et al. 2005 Int J Gynecol Cancer 15 Supl 3:274-81); CD5 (Calin, G.A. et al. 2006 Semin Oncol. 33(2):167-73; CD19 (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4): 139-48); CD20 (Thomas, D.A. et al. 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5):1125-36); CD22 (Kreitman, R.J. 2006 AAPS J. 18;8(3):E532-51); CD23 (Rosati, S. et al. 2005 Curr Top Microbiol Immunol. 5;294:91-107); CD25 (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); CD27 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); CD28 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); CD36 (Ge, Y. 2005 Lab Hematol. 11(1):31-7); CD40/CD154 (Messmer, D. et al. 2005 Ann N Y Acad Sci. 1062:51-60); CD45 (Jurcic, J.G. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):339-46); CD56 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); CD79a/CD79b (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48; Chu, P.G. et al. 2001 Appl Immunohistochem Mol Morphol. 9(2):97-106); CD103 (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); CDK4 (Lee, Y.M. et al. 2006 Cell Cycle 5(18):2110-4); CEA (antígeno carcinoembrionario; Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46; Tellez-Avila, F.I. et al. 2005 Rev Invest Clin. 57(6):814-9); CTLA4 (Peggs, K.S. et al. 2006 Curr Opin Immunol. 18(2):206-13); EGF-R (receptor de factor de crecimiento epidérmico; Adenis, A. et al. 2003 Bull Cancer. 90 n.º de espec.: S228-32); Erb (ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. et al. 2002 Oncogene 21(57):8732-40; Rimon, E. et al. 2004 Int J Oncol. 24(5):1325-38); GAGE (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. et al. 2006 Int J Cancer. 118(1): 123-8); GD2/GD3/GM2 (Livingston, P.O. et al. 2005 Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-25); gp100 (Lotem, M. et al. 2006 J Immunother. 29(6):616-27); HER-2/neu (Kumar, Pal S et al. 2006 Semin Oncol. 33(4):386-91); papilomavirus humano E6/papilomavirus humano E7 (DiMaio, D. et al. 2006 Adv Virus Res. 66:125-59; KSA (17-1A) (Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-80); MAGE (MAGE-1; MAGE-3; (Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); MART (Kounalakis, N. et al. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):377-82; MUC-1 (Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46); MUM-1 (Castelli, C. et al. 2000 J Cell Physiol. 182(3):323-31); N-acetilglucosaminiltransferasa (Dennis, J.W. 1999 Biochim Biophys Acta. 6;1473(1):21-34); p15 (Gil, J. et al. 2006 Nat Rev Mol Cell Biol. 7(9):667-77); PSA (antígeno específico de próstata; Cracco, C.M. et al. 2005 Minerva Urol Nefrol. 57(4):301-11); PSMA (Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-80); sTn (Holmberg, L.A. 2001 Expert Opin Biol Ther. 1 (5):881-91); receptor de TNF (receptor de TNF-α, receptor de TNF-β; o receptor de TNF-γ; van Horssen, R. et al. 2006 Oncologist. 11(4):397-408; Gardnerova, M. et al. 2000 Curr Drug Targets. 1(4):327-64); o receptor de VEGF (O'Dwyer. P.J. 2006 Oncologist. 11(9):992-8).

Los antígenos adicionales asociados a tumores para dicho uso (y las publicaciones que describen anticuerpos específicamente reactivos para dichos antígenos) incluyen ADAM-9 (Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0172350; Publicación PCT n.º WO 06/084075); ALCAM (Publicación PCT n.º WO 03/093443); carboxipeptidasa M (Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0166291); CD46 (Patente de los Estados Unidos n.º 7.148.038; Publicación PCT n.º WO 03/032814); Citoqueratina 8 (Publicación PCT n.º WO 03/024191); Receptores de efrina (y, en particular, EphA2 (Patente de los Estados Unidos n.º 7.569.672; Publicación PCT n.º WO 06/084226); Integrina alfa-V-beta-6 (Publicación PCT n.º WO 03/087340); JAM-3 (Publicación PCT n.º WO 06/084078); KID3 (Publicación PCT n.º WO 05/028498); KID31 (Publicación PCT n.º WO 06/076584); LUCA-2 (Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0172349; Publicación PCT n.º WO 06/083852); Oncostatina M (receptor beta de oncostatina) (Patente de los Estados Unidos n.º 7.572.896; Publicación PCT n.º WO 06/084092); PIPA (Patente de los Estados Unidos n.º 7.405.061; Publicación PCT n.º WO 04/043239); RAAG10 (Patente de los Estados Unidos n.º 7.527.969; Publicación PCT n.º WO 04/001381); ROR1 (Patente de los Estados Unidos n.º 5.843.749); TES7 (Publicación PCT n.º WO 08/066691); y el receptor de transferrina (Patente de los Estados Unidos n.º 7.572.895; Publicación PCT n.º WO 05/121179).

También son de interés los antígenos específicos de agentes infecciosos particulares, por ejemplo, agentes víricos que incluyen, pero sin limitación, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), gripe, virus del papiloma humano (VPH), pie y boca (coxsackievirus), el virus de la rabia, virus del herpes simple (VHS) y los agentes causantes de la gastroenteritis, incluidos los rotavirus, adenovirus, calicivirus, astrovirus y virus de Norwalk; agentes bacterianos incluyendo, pero sin limitación, *E. coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Hemophilus influenzae*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Streptococcus pneumoniae*, agentes fúngicos y parásitos, tales como Giardi.

Como alternativa, dicho epítopo puede unirse a un receptor Fc (por ejemplo, FcγRI o FcγRII), para, por ejemplo, redirigir las células leucémicas monocíticas agudas a sustratos para la lisis celular mediada por células NK.

5.1 DOMINIOS DE UNIÓN A DIACUERPOS

Los diacuerpos de la presente divulgación comprenden dominios de unión al antígeno generalmente derivados de inmunoglobulinas o anticuerpos. Los anticuerpos de los que se derivan los dominios de unión usados en los métodos pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos (por ejemplo, ser humano, primate no humano, murino, burro, ovejas, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo). Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Como se usa en el presente documento, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana, e

incluyen anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o bibliotecas de secuencias codificantes de inmunoglobulinas humanas, sintéticas o de ratones que expresen anticuerpos de genes humanos.

La divulgación contempla el uso de cualquiera de los anticuerpos conocidos en la técnica para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedades inflamatorias o enfermedades infecciosas como fuente de dominios de unión para los diacuerpos de la divulgación. Los ejemplos no limitantes de los anticuerpos del cáncer conocidos se proporcionan en el apartado 5.7.1, así como otros anticuerpos específicos para los antígenos diana enumerados y anticuerpos contra los antígenos del cáncer enumerados en el apartado 5.6.1; los ejemplos no limitantes de los anticuerpos conocidos para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad autoinmune y enfermedad inflamatoria se proporcionan en el apartado 5.7.2., así como anticuerpos contra antígenos diana enumerados y anticuerpos contra los antígenos enumerados en el apartado 5.6.2; en otras realizaciones, es posible usar anticuerpos contra epítopos asociados con enfermedades infecciosas como se enumera en el apartado 5.6.3. En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden una región Fc variante que comprende una o más modificaciones de aminoácidos, que se han identificado con una función efectora conferida y/o afinidad potenciada por el FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. Un ejemplo no limitante de los anticuerpos que pueden usarse para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios junto con las moléculas de la divulgación se presenta en la Tabla 9, y un ejemplo no limitante de los anticuerpos que pueden usarse para el tratamiento o la prevención de trastornos autoinmunitarios se presenta en la tabla 10.

Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de los anticuerpos en seres humanos y los ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar diacuerpos con dominios variables procedentes de anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados. Los dominios variables de anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo los métodos de presentación en fagos anteriormente descritos usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.444.887 y 4.716.111; las publicaciones internacionales n.º WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo, una variante o un fragmento del mismo, que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región marco conservada que tiene esencialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana o una CDR que tiene esencialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado puede comprender esencialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los que todas o esencialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o esencialmente todas las regiones marco conservadas son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana.

Las regiones marco conservadas y las CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder exactamente a las secuencias precursoras, por ejemplo, la CDR donante o la región marco conservada consenso pueden mutagenizarse mediante la sustitución, inserción o eliminación de al menos un resto para que la CDR o resto marco de ese sitio no corresponda a la secuencia consenso o al anticuerpo donante. Dichas mutaciones, sin embargo, preferentemente no son extensas. Normalmente, al menos el 75 % de los restos de los anticuerpos humanizados corresponderán con los de la región marco conservada (FR) precursora y las secuencias CDR, más frecuentemente el 90 %, y lo más preferentemente más del 95 %. Los anticuerpos humanizados pueden ser producidos usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, el injerto de CDR (patente europea n.º EP 239400; la publicación internacional n.º WO 91/09967; y las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), sustitución en superficie o acondicionamiento de la superficie (patentes europeas n.º EP 592.106 y EP 519.596; Padlan (1991) "A Possible Procedure For Reducing The Immunogenicity Of Antibody Variable Domains While Preserving Their Ligand-Binding Properties", Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) "Human-Engineered Monoclonal Antibodies Retain Full Specific Binding Activity By Preserving Non-CDR Complementarity-Modulating Residues", Protein Engineering 7(6):805-814; y Roguska et al. (1994) "Humanization Of Murine Monoclonal Antibodies Through Variable Domain Resurfacing", Proc Natl Acad Sci USA 91:969-973), redistribución de cadenas (patente de los Estados Unidos n.º 5.565.332), y técnicas desveladas en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.407.213, 5.766.886, 5.585.089, la publicación internacional n.º WO 9317105, Tan et al. (2002) "Superhumanized' Antibodies: Reduction Of Immunogenic Potential By Complementarity-Determining Region Grafting With Human Germline Sequences: Application To An Anti-CD28", J. Immunol. 169:1119-25, Caldas et al. (2000) "Design And Synthesis Of Germline-Based Hemi-Humanized Single-Chain Fv Against The CD18 Surface Antigen", Protein Eng. 13:353-60, Morea et al. (2000) "Antibody Modeling: Implications For Engineering And Design", Methods 20:267-79, Baca et al. (1997) "Antibody Humanization Using Monovalent Phage Display", J. Biol. Chem. 272:10678-84, Roguska et al. (1996) "A Comparison Of Two Murine Monoclonal Antibodies Humanized By CDR-Grafting And Variable Domain Resurfacing", Protein Eng. 9:895-904, Couto et al. (1995) "Designing Human Consensus Antibodies With Minimal Positional Templates", Cancer Res. 55 (23 Sup):5973s-5977s, Couto et al. (1995) "Anti-BA46 Monoclonal Antibody Mc3: Humanization Using A Novel Positional Consensus And *In Vivo* And *In Vitro* Characterization", Cancer Res. 55:1717-22, Sandhu (1994) "A Rapid Procedure For The Humanization Of Monoclonal Antibodies", Gene 150:409-10, Pedersen et al. (1994) "Comparison Of Surface Accessible Residues In Human And Murine Immunoglobulin Fv Domains. Implication For Humanization

Of Murine Antibodies", J. Mol. Biol. 235:959-973, Jones et al. (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse", Nature 321:522-525, Riechmann et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy", Nature 332:323-327 y Presta (1992) "Antibody Engineering", Curr. Op. Biotech. 3(4):394-398. A menudo, los restos marco de las regiones marco conservadas serán sustituidos por el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para modificar, preferentemente, mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de la región marco conservada se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la modelización de las interacciones de los restos de CDR y de la región marco conservada para identificar los restos marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar los restos marco poco habituales en posiciones específicas. (Véanse, por ejemplo, Queen et al., Patente de los Estados Unidos n.º 5.585.089; Publicaciones de los Estados Unidos n.º 2004/0049014 y 2003/0229208; Patentes de los Estados Unidos n.º 6.350.861; 6.180.370; 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101 y Riechmann et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy", Nature 332:323-327.).

En una realización más preferida, el dominio de unión humanizado se une específicamente al mismo epítopo que el anticuerpo murino donante. Los expertos en la materia apreciarán que la divulgación engloba el injerto de CDR de los anticuerpos en general. Por lo tanto, los anticuerpos donantes y aceptores pueden derivarse de animales de la misma especie e incluso de la misma clase o subclase de anticuerpo. Más habitualmente, sin embargo, los anticuerpos donantes y aceptores se derivan de animales de diferente especie. Por lo general, el anticuerpo donante es un anticuerpo no humano, tal como puede ser un mAb de roedor, y el anticuerpo aceptor es un anticuerpo humano.

En algunas realizaciones, al menos una CDR del anticuerpo donante se injerta en el anticuerpo humano. En otras realizaciones, al menos dos y, preferentemente, las tres CDR de cada una de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera se injertan en el anticuerpo humano. Las CDR pueden comprender las CDR de Kabat, las CDR de bucles estructurales o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la divulgación engloba un anticuerpo contra FcγRIIB humanizado que comprende al menos una cadena pesada a la que se injerta la CDR y al menos una cadena ligera a la que se injerta la CDR.

Los diacuerpos usados en los métodos incluyen derivados que son modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al diacuerpo. Por ejemplo, pero sin limitación, los derivados de diacuerpos incluyen diacuerpos que han sido modificados, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Se pueden llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no convencionales.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo se derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina tal como pueden ser anticuerpos que tengan una región variable derivada de un anticuerpo no humano y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison (1985) "Transfectomas Provide Novel Chimeric Antibodies", Science 229:1202-1207; Oi et al. (1986) "Chimeric Antibodies," BioTechniques 4:214-221; Gillies et al. (1989) "High-Level Expression Of Chimeric Antibodies Using Adapted cDNA Variable Region Cassettes", J. Immunol. Methods 125:191-202; y las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.311.415, 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397.

A menudo, los restos marco de las regiones marco conservadas serán sustituidos por el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para modificar, preferentemente, mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de la región marco conservada se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la modelización de las interacciones de los restos de CDR y de la región marco conservada para identificar los restos marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar los restos marco poco habituales en posiciones específicas. (Véanse, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.585.089; y Riechmann et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy", Nature 332:323-327).

Los anticuerpos monoclonales a partir de los que pueden prepararse los dominios de unión de los diacuerpos de la divulgación usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma que incluyen aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, et al., en: "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas", págs. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, no se limita a los anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método mediante el que se produce.

Los métodos para producir y examinar anticuerpos específicos usando la tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitante, es posible inmunizar ratones con un antígeno de interés o

una célula que exprese dicho antígeno. Una vez que se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo, los anticuerpos específicos para el antígeno se detectan en el suero del ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. A continuación, se fusionan los esplenocitos mediante técnicas bien conocidas a cualquiera de las células de mieloma apropiadas. Se seleccionan y se clonan los hibridomas por dilución limitante. Los clones de hibridomas se someten luego a ensayo mediante métodos conocidos en la técnica para determinar células que secreten anticuerpos capaces de unirse al antígeno. El fluido de ascitis, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, puede generarse inoculando ratones por vía intraperitoneal con clones de hibridoma positivos. Los antígenos de interés incluyen, pero sin limitación, antígenos asociados con los cánceres proporcionados en el apartado 5.8.1, antígenos asociados con las enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias proporcionadas en el apartado 5.8.2, antígenos asociados con las enfermedades infecciosas proporcionadas en el apartado 5.8.3, y las toxinas proporcionadas en el apartado 5.8.4.

También es posible generar anticuerpos usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, los dominios funcionales del anticuerpo son presentados en la superficie de las partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótidos que las codifican. En una realización particular, dicho fago puede usarse para presentar dominios de unión al antígeno, tal como el fragmento Fab y Fv o Fv estabilizado con enlaces disulfuro, expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). El fago que expresa un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con un antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. El fago usado en estos métodos normalmente son fagos filamentosos, incluyendo fd y M13. Los dominios de unión al antígeno son expresados como proteína fusionada de forma recombinante a la proteína del gen III o gen VIII del fago. Los ejemplos de los métodos de presentación en fagos que se pueden usar para preparar inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, de la presente divulgación incluyen los desvelados en Brinkmann et al. (1995) "Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragments", J. Immunol. Methods, 182:41-50; Ames et al. (1995) "Conversion Of Murine Fabs Isolated From A Combinatorial Phage Display Library To Full Length Immunoglobulins", J. Immunol. Methods, 184:177-186; Kettleborough et al. (1994) "Isolation Of Tumor Cell-Specific Single-Chain Fv From Immunized Mice Using Phage-Antibody Libraries And The Re-Construction Of Whole Antibodies From These Antibody Fragments", Eur. J. Immunol., 24:952-958; Persic et al. (1997) "An Integrated Vector System For The Eukaryotic Expression Of Antibodies Or Their Fragments After Selection From Phage Display Libraries", Gene, 187:9-18; Burton et al. (1994) "Human Antibodies From Combinatorial Libraries", Advances in Immunology, 57:191-280; Publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes de los Estados Unidos n.º 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

La tecnología de presentación en fagos puede usarse para aumentar la afinidad de un anticuerpo por su antígeno. Esta técnica sería útil para obtener anticuerpos de alta afinidad. La tecnología, conocida como maduración por afinidad, emplea la mutagénesis o el paseo por las CDR y la reselección usando el antígeno relacionado para identificar los anticuerpos que se unen con mayor afinidad al antígeno en comparación con el anticuerpo inicial o parental (véase, por ejemplo, Glaser et al. (1992) "Dissection Of The Combining Site In A Humanized Anti-Tac Antibody", J. Immunology 149:2607-2614). La mutagenización de codones completos en lugar de nucleótidos simples produce un repertorio semialeatorizado de mutaciones de aminoácidos. Es posible construir bibliotecas que consisten en una combinación de clones variantes, cada uno de los cuales difiere en modificaciones de un solo aminoácido en una sola CDR y que contienen variantes que representan cada posible sustitución de aminoácidos para cada resto CDR. Los mutantes con mayor afinidad de unión por el antígeno pueden explorarse poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Se puede usar cualquier método de rastreo conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con mayor avidez por el antígeno (por ejemplo, ELISA) (véase Wu et al. (1998) "Stepwise *In vitro* Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized mAb", Proc Natl. Acad Sci.USA 95:6037-6042; Yelton et al. (1995) "Affinity Maturation Of The Br96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis", J. Immunology 155:1994-2004). También es posible el paseo por las CDR que asigna al azar la cadena ligera (véase Schier et al. (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site", J. Mol. Bio. 263:551-567).

La presente divulgación también engloba el uso de dominios de unión que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios de unión que se describen en el presente documento o que se conocen en la técnica con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones marco conservadas o CDR. Preferentemente, las mutaciones de estos dominios de unión mantienen o mejoran la avidez y/o afinidad de los dominios de unión por FcγRIIB al que se unen de manera inmunoespecífica. Se pueden usar técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, inmunoensayos) para determinar la afinidad de un anticuerpo por un determinado antígeno.

Las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia pueden usarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR, que producen sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, los derivados incluyen sustituciones de menos de 15 aminoácidos, sustituciones de menos de 10

aminoácidos, sustituciones de menos de 5 aminoácidos, sustituciones de menos de 4 aminoácidos, sustituciones de menos de 3 aminoácidos o sustituciones de menos de 2 aminoácidos con respecto al anticuerpo original o fragmento del mismo. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones conservativas de aminoácidos realizadas en uno o más de los restos de aminoácidos no esenciales previstos.

5.1.1 DIACUERPOS QUE COMPRENDEN SITIOS DE UNIÓN AL EPÍTOPO QUE SE UNEN DE MANERA INMUNOESPECÍFICA A FcγRIIB

En una realización particular, al menos uno de los dominios de unión de los diacuerpos de la divulgación es agonista hacia al menos una actividad de FcγRIIB. En una realización de la divulgación, dicha actividad es la inhibición de la señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En otra realización, el dominio de unión inhibe la activación de linfocitos B, la proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos, el flujo de entrada de calcio intracelular de linfocitos B, la progresión del ciclo celular o la actividad de una o más moléculas de la señalización aguas abajo en la vía de transducción de señales de FcγRIIB. En otra realización más, el dominio de unión potencia la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En una realización adicional de la divulgación, el dominio de unión inhibe la actividad de MAP cinasa o el reclutamiento de Akt en la vía de señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En otra realización, el dominio de unión es agonista de la inhibición de la señalización de FcεRI mediada por FcγRIIB. En una realización particular, dicho dominio de unión inhibe la activación de mastocitos inducida por FcεRI, la movilización del calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina. En otra realización, los dominios de unión de molécula de diacuerpo estimulan la fosforilación de FcγRIIB, estimulan el reclutamiento de SHIP, estimulan la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, o inhiben la activación de los miembros de la familia de las MAP cinasas (por ejemplo, Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En otra realización más, los dominios de unión de la molécula de diacuerpo potencian la fosforilación de tirosinas de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra realización, los dominios de unión de la molécula de diacuerpo inhiben la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos.

En otra realización, los dominios de unión antagonizan al menos una actividad de FcγRIIB. En una realización, dicha actividad es la activación de la señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En una realización particular, los dominios de unión potencian la actividad de los linfocitos B, la proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos, el flujo de entrada de calcio intracelular o la actividad de una o más moléculas de señalización aguas abajo en la vía de transducción de señales de FcγRIIB. En otra realización particular más, los dominios de unión disminuyen la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En una realización adicional de la molécula de diacuerpo, los dominios de unión potencian la actividad de MAP cinasa o el reclutamiento de Akt en la vía de señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En otra realización, los dominios de unión son antagonistas de la inhibición de la señalización de FcεRI mediada por FcγRIIB. En una realización particular, los dominios de unión potencian la activación de mastocitos inducida por FcεRI, la movilización del calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina. En otra realización, los dominios de unión inhiben la fosforilación de FcγRIIB, inhiben el reclutamiento de SHIP, inhiben la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, potencian la activación de los miembros de la familia de las MAP cinasas (por ejemplo, Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En otra realización más, los dominios de unión inhiben la fosforilación de tirosinas de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra realización, los dominios de unión potencian la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos. En otra realización, los dominios de unión impiden la fagocitosis, el aclaramiento de partículas opsonizadas por macrófagos esplénicos.

En otras realizaciones, al menos uno de los dominios de unión puede usarse para dirigir los diacuerpos de la divulgación a células que expresen FcγRIIB.

En una realización particular, uno de los dominios de unión se deriva de un anticuerpo monoclonal murino producido por el clon 2B6 o 3H7, que tiene números de registro ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. Los hibridomas productores de anticuerpos 2B6 y 3H7 se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 13 de agosto de 2002 en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con fines de los procedimientos en materia de patentes, y los números de registro asignados PTA-4591 (para el hibridoma productor de 2B6) y PTA-4592 (para el hibridoma productor de 3H7), respectivamente. En una realización preferida, los dominios de unión son humanos o han sido humanizados, preferentemente se derivan de una versión humanizada del anticuerpo producido por el clon 3H7 o 2B6.

La divulgación también engloba diacuerpos con dominios de unión de otros anticuerpos, que se unen específicamente a FcγRIIB, preferentemente FcγRIIB humano, más preferentemente FcγRIIB humano, nativo, que se derivan de clones que incluyen, pero sin limitación, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 y 1F2 que tienen los números de registro ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente. Los hibridomas productores de los clones anteriormente identificados fueron depositados en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 7 de mayo de 2004. En las realizaciones preferidas, los dominios de unión de los anticuerpos anteriormente descritos están humanizados.

En una realización específica, los dominios de unión utilizados en los diacuerpos de la presente divulgación son de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR), preferentemente, las 6 CDR) del anticuerpo producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. En otra realización, el dominio de unión se une al mismo epítopo que el anticuerpo monoclonal murino producido a partir del clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, respectivamente y/o compite con el anticuerpo monoclonal murino producido a partir del clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, tal como se determina, por ejemplo, en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo competitivo apropiado, y también se une a FcγRIIB con una afinidad superior a la del dominio de unión a FcγRIIA.

La presente invención también engloba diacuerpos con dominios de unión que comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable y/o cadena ligera variable que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable y/o cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. La presente divulgación engloba además diacuerpos con dominios de unión que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de lo que se une el anticuerpo o fragmento del mismo a FcγRIIA, y que comprende una secuencia de aminoácidos de una o más de las CDR que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos puede realizarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia, incluyendo las búsquedas de proteínas BLAST.

La presente divulgación también engloba el uso de diacuerpos que contienen dominios de unión que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de lo que el dominio de unión se une a FcγRIIA, que son codificados por una secuencia de nucleótidos que se hibrida a la secuencia de nucleótidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 en condiciones rigurosas. En una realización preferida, el dominio de unión se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que FcγRIIA, y comprende una cadena ligera variable y/o cadena pesada variable codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de cadena ligera variable y/o cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 en condiciones rigurosas. En otra realización preferida, los dominios de unión se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que FcγRIIA, y comprenden una o más CDR codificadas por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero sin limitación, hibridación a ADN unido al filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6X a aproximadamente 45 °C seguido de uno o más lavados en SSC 0,2X/SDS al 0,1 % a aproximadamente 50-65 °C, condiciones altamente rigurosas tales como la hibridación a ADN unido al filtro en SSC 6X a aproximadamente 45 °C seguido de uno o más lavados en SSC 0,1X/SDS al 0,2 % a aproximadamente 60 ºC o cualquier otra condición rigurosa de hibridación conocida por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc., NY, en las páginas 6.3.1 a 6.3.6 y 2.10.3).

La presente divulgación también engloba el uso de dominios de unión que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios de unión que se describen anteriormente con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones marco conservadas o CDR. Preferentemente, las mutaciones de estos dominios de unión mantienen o mejoran la avidez y/o afinidad de los dominios de unión por FcγRIIB al que se unen de manera inmunoespecífica. Se pueden usar técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, inmunoensayos) para determinar la afinidad de un anticuerpo por un determinado antígeno.

Las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia pueden usarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR, que producen sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, los derivados incluyen sustituciones de menos de 15 aminoácidos, sustituciones de menos de 10 aminoácidos, sustituciones de menos de 5 aminoácidos, sustituciones de menos de 4 aminoácidos, sustituciones de menos de 3 aminoácidos o sustituciones de menos de 2 aminoácidos con respecto al anticuerpo original o fragmento del mismo. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones conservativas de aminoácidos realizadas en uno o más de los restos de aminoácidos no esenciales previstos.

En las realizaciones preferidas, los dominios de unión se derivan de anticuerpos humanizados. Un anticuerpo específico FcγRIIB humanizado puede comprender esencialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los que todas o esencialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o esencialmente todas las regiones marco conservadas son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana.

Los diacuerpos de la presente divulgación comprenden dominios variables humanizados específicos para FcγRIIB en los que una o más regiones de una o más CDR de las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano (el anticuerpo receptor) han sido sustituidas por partes análogas de una o más CDR de un anticuerpo monoclonal donante que se une específicamente a FcγRIIB, con una afinidad mayor que FcγRIIA, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados se unen al mismo epítopo que 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, respectivamente.

En una realización preferida, las regiones CDR del dominio de unión a FcγRIIB humanizado se derivan de un anticuerpo murino específico de FcγRIIB. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento comprenden alteraciones, incluyendo, pero sin limitación, eliminaciones, inserciones o modificaciones de aminoácidos, del anticuerpo aceptor, es decir, regiones marco conservadas de dominio variable de cadena pesada y/o ligera, humanas, que son necesarias para conservar la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal donante. En algunas realizaciones, las regiones marco conservadas de los anticuerpos humanizados que se describen en el presente documento no consisten necesariamente en la secuencia de aminoácidos exacta de la región marco conservada de una región variable del anticuerpo humano natural, sino que contiene diversas modificaciones, incluyendo, pero sin limitación, eliminaciones, inserciones o modificaciones de aminoácidos que alteran las propiedades del anticuerpo humanizado, por ejemplo, que mejoran las propiedades de unión de una región del anticuerpo humanizado que es específica de la misma diana que el anticuerpo específico de FcγRIIB murino. En las realizaciones más preferidas, se realiza una cantidad mínima de modificaciones en la región marco conservada con el fin de evitar introducciones a gran escala de restos marco no humanos y para garantizar una inmunogenicidad mínima del anticuerpo humanizado en los seres humanos. El anticuerpo monoclonal donante preferentemente es un anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2.

En una realización específica, el dominio de unión engloba los dominios variables de un anticuerpo con injerto de CDR que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que se une el anticuerpo a FcγRIIA, en la que el anticuerpo con injerto de CDR comprende un dominio de región variable de cadena pesada que comprende restos marco del anticuerpo receptor y restos del anticuerpo monoclonal donante, que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que el anticuerpo se une a FcγRIIA, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. En otra realización específica, los diacuerpos de la divulgación comprenden dominios variables de un anticuerpo con injerto de CDR que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que el anticuerpo se une a FcγRIIA, en donde el anticuerpo con injerto de CDR comprende un dominio de región variable de cadena ligera que comprende restos marco del anticuerpo receptor y restos del anticuerpo monoclonal donante, que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que el anticuerpo se une a FcγRIIA, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2.

Los dominios variables anti-FcγRIIB humanizados usados en la molécula de diacuerpo pueden tener una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25) y/o CDR2 (SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:27) y/o CDR3 (SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29) y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO:30 o SEQ ID NO:31) y/o una CDR2 (SEQ ID NO:32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO:34 o SEQ ID NO:35) y/o CDR3 (SEQ ID NO:36 o SEQ ID NO:37).

En una realización específica, el diacuerpo comprende los dominios variables de un anticuerpo 2B6 humanizado, en donde la región VH consiste en los segmentos FR del segmento VH de la línea germinal humana VH1-18 (Matsuda et al. (1998) "The Complete Nucleotide Sequence Of The Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus", J. Exp. Med. 188:2151-2162) y JH6 (Ravetch et al. (1981) "Structure Of The Human Immunoglobulin Mu Locus: Characterization Of Embryonic And Rearranged J And D Genes", Cell 27(3 Pt. 2): 583-91), y una o más regiones CDR de la VH de 2B6, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 26 o la SEQ ID NO: 28. En una realización, la VH de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38. En otra realización, el dominio de VH de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de Hu2B6VH, SEQ ID NO: 85 y puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 86. En otra realización específica, el diacuerpo comprende además una región VL, que consiste en los segmentos FR del segmento VL de la línea germinal humana VK-A26 (Lautner-Rieske et al. (1992) "The Human Immunoglobulin Kappa Locus. Characterization Of The Duplicated A Regions", Eur. J. Immunol. 22: 1023-1029) y JK4 (Hieter et al. (1982) "Evolution Of Human Immunoglobulin Kappa J Region Genes", J. Biol. Chem. 257: 1516-22), y una o más regiones CDR de VL de 2B6, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 36. En una realización, la VL de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39; la SEQ ID NO: 40 o la SEQ ID NO: 41. En una realización específica, la VL de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de Hu2B6VL, SEQ ID NO: 87 y puede codificarse por la secuencia de nucleótidos proporcionada en la SEQ ID NO: 88.

En otra realización específica, el diacuerpo tiene los dominios variables de un anticuerpo 3H7 humanizado, en donde la región VH consiste en los segmentos FR de un segmento VH de la línea germinal humana y las regiones CDR de la VH de 3H7, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35. En otra realización específica, el anticuerpo 3H7 humanizado comprende además las regiones VL, que consisten en los segmentos FR de un

segmento VL de la línea germinal humana y las regiones CDR de VL de 3H7, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

En particular, los dominios de unión se unen de manera inmunoespecífica a los dominios extracelulares de la proteína FcγRIIB humana nativa y comprenden (o, como alternativa, consisten en) las secuencias de CDR de 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, en cualquiera de las siguientes combinaciones: una CDR1 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH y una CDR1 de VL; una CDR2 de VH y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR3 de VH y una CDR1 de VH; una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR3 de VH y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH1, una CDR2 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR1 de VL, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; o cualquier combinación de las CDR de VH y CDR de VL desveladas en el presente documento.

Los anticuerpos para derivar dominios de unión que se han de incluir en los diacuerpos de la divulgación además pueden caracterizarse mediante cartografía de epítopos, de modo que sea posible seleccionar anticuerpos que tengan la mayor especificidad por FcγRIIB en comparación con FcγRIIA. Los métodos de cartografía de epítopos de los anticuerpos son bien conocidos en la técnica y están englobados dentro de los métodos de la divulgación. En ciertas realizaciones, las proteínas de fusión que comprenden una o más regiones de FcγRIIB pueden usarse para cartografiar el epítopo de un anticuerpo de la divulgación. En una realización específica, la proteína de fusión contiene la secuencia de aminoácidos de una región de un FcγRIIB fusionada a la parte Fc de una IgG2 humana. Cada proteína de fusión además puede comprender sustituciones y/o reemplazos de aminoácidos de ciertas regiones del receptor por la región correspondiente de un receptor homólogo, por ejemplo, FcγRIIA, como se muestra en la siguiente Tabla 2. pMGX125 y pMGX132 contienen el sitio de unión a IgG del receptor FcγRIIB, el primero con el extremo C-terminal de FcγRIIB y el último con el extremo C-terminal de FcγRIIA y pueden usarse para diferenciar la unión C-terminal. El resto tienen sustituciones de FcγRIIA en el sitio de unión a IgG y bien el extremo N-terminal de FcγIIA o FcγIIB. Estas moléculas pueden ayudar a determinar parte de la molécula receptora en la que se unen los anticuerpos.

Tabla 2. Lista de proteínas de fusión que se pueden usar para investigar el epítopo de los anticuerpos anti-FcγRIIB monoclonales. Los restos 172 a 180 pertenecen al sitio de unión a IgG de FcγRIIA y B. Los aminoácidos específicos de la secuencia de FcγRIIA están en negrita.

Plásmido	Receptor	Extremo N-terminal	172-180	SEQ ID NO:	Extremo C-terminal
pMGX125	RIIb	IIb	KKFSRSDPN	43	APS SS (IIb)
pMGX126	RIIa/b	IIa	QKFSRLDPN	44	APS SS (IIb)
pMGX127		IIa	QKFSRLDPT	45	APS SS (IIb)
pMGX128		IIb	KKFSRLDPT	46	APS SS (IIb)
pMGX129		IIa	QKFSHLDPT	47	APS SS (IIb)
pMGX130		IIb	KKFSHLDPT	48	APS SS (IIb)
pMGX131		IIa	QKFSRLDPN	49	VPSMGSSS(IIa)
pMGX132		IIb	KKFSRSDPN	50	VPSMGSSS(IIa)
pMGX133	RIIa-131R	IIa	QKFSRLDPT	51	VPSMGSSS(IIa)

(continuación)

Plásmido	Receptor	Extremo N-terminal	172-180	SEQ ID NO:	Extremo C-terminal
pMGX134	RIIa-131H	IIa	QKFSHLDPT	52	VPSMGSSS(IIa)
pMGX135		IIb	KKFSRLDPT	53	VPSMGSSS(IIa)
pMGX136		IIb	KKFSHLDPT	54	VPSMGSSS(IIa)
Nota: APSSS es la SEQ ID NO: 309; VPSMGSSS es la SEQ ID NO: 310					

Las proteínas de fusión pueden usarse en cualquier ensayo bioquímico para determinar la unión de un anticuerpo anti-FcγRIIB de la divulgación, por ejemplo, un ensayo ELISA. En otras realizaciones, es posible realizar una confirmación adicional de la especificidad por el epítopo usando péptidos con restos específicos reemplazados por los de la secuencia de FcγRIIA.

Los anticuerpos se pueden caracterizar mediante ensayos para identificar la función de los anticuerpos de la divulgación, en particular, la actividad para modular la señalización de FcγRIIB. Por ejemplo, los ensayos de caracterización pueden medir la fosforilación de los restos de tirosina del motivo ITIM de FcγRIIB, o medir la inhibición de la movilización de calcio generada por el receptor de linfocitos B. Los ensayos de caracterización pueden ser ensayos a base de células o libres de células.

Se ha establecido bien en la técnica que, en los mastocitos, la agregación conjunta de FcγRIIB con el receptor de IgE de alta afinidad, FcεRI, da lugar a la inhibición de la desgranulación inducida por antígeno, la movilización de calcio y la producción de citocinas (Metcalfe DD et al. (1997) "Mast Cells", Physiol. Rev. 77:1033-1079; Long E. O. (1999) "Regulation Of Immune Responses Through Inhibitory Receptors", Annu. Rev. Immunol. 17: 875-904). Los detalles moleculares de esta vía de señalización se han dilucidado recientemente (Ott V. L. (2002) "Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of FcgammaIIB Inhibition OfFc Epsilon RI Signaling", J. Immunol. 162(9):4430-4439). Una vez agregado junto con FcεRI, FcγRIIB se fosforila rápidamente en tirosina en su motivo ITIM, y luego recluta inositol-5-fosfatasa que contiene la homología de Src-2 (SHIP), una inositol polifosfato 5-fosfatasa que contiene el dominio SH2, que, a su vez, se fosforila y se asocia con Shc y $p62^{dok}$ ($p62^{dok}$ es el prototipo de una familia de moléculas adaptadoras, que incluye dominios de señalización, tales como un dominio de homología de pleckstrina amino-terminal (dominio PH), un dominio PTB, y una región carboxi-terminal que contiene motivos PXXP y numerosos sitios de fosforilación (Carpino et al. (1997) "p62(dok): A Constitutively Tyrosine-Phosphorylated, GAP-Associated Protein In Chronic Myelogenous Leukemia Progenitor Cells", Cell, 88: 197-204; Yamanshi et al. (1997) "Identification Of The Abl-And rasGAP-Associated 62 kDa Protein As A Docking Protein, Dok", Cell, 88:205-211).

Los anticuerpos anti-FcγRIIB que se usan en la divulgación del mismo modo se pueden caracterizar por su capacidad para modular una o más respuestas mediadas por IgE. Preferentemente, se usarán las estirpes celulares que coexpresan el receptor de alta afinidad por IgE y el receptor de baja afinidad por FcγRIIB con el fin de caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB para modular las respuestas mediadas por IgE. En una realización específica, se usarán células de una estirpe celular de leucemia basófila de rata (RBL-H23; et al. (1981) "IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones", Eur. J. Immunol. 11: 317-323) transfectadas con FcγRIIB humano de longitud completa. RBL-2H3 es una estirpe celular de rata bien caracterizada que se ha usado ampliamente para estudiar los mecanismos de señalización tras la activación celular mediada por IgE. Cuando se expresa en células RBL-2H3 y se coagrega con FcεRI, FcγRIIB inhibe la movilización del calcio, la desgranulación y la producción de citocinas inducidas por FcεRI (Malbec et al. (1998) "Fc Epsilon Receptor I-Associated Lyn-Dependent Phosphorylation Of Fc Gamma Receptor IIB During Negative Regulation Of Mast Cell Activation", J. Immunol 160:1647-1658; Daeron et al. (1995) "Regulation Of High-Affinity IgE Receptor-Mediated Mast Cell Activation By Murine Low-Affinity IgG Receptors", J. Clin. Invest. 95:577; Ott V. L. (2002) "Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of FcgammaIIB Inhibition Of Fc Epsilon RI Signaling", J. Immunol. 162(9):4430-4439).

Los anticuerpos que se usan en la divulgación también pueden caracterizarse por su inhibición de la activación de los mastocitos inducida por FcεRI. Por ejemplo, es posible usar células de una estirpe celular de leucemia basófila de rata (RBL-H23; et al. (1981) "IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones", Eur. J. Immunol. 11:317-323) que se ha transfectado con FcγRIIB son sensibilizadas con IgE y estimuladas con fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón, para agregar solo FcεRI, o con anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón, completos para coagregar FcγRIIB y FcεRI. En este sistema, la modulación indirecta de las moléculas de señalización aguas abajo puede ensayarse tras la adición de anticuerpos de la divulgación a las células sensibilizadas y estimuladas. Por ejemplo, pueden ensayarse la fosforilación de tirosina de FcγRIIB y el reclutamiento y fosforilación de SHIP, la activación de miembros de la familia MAP cinasa, incluyendo, pero sin limitación, Erk1, Erk2, JNK o p38; y la fosforilación de tirosina de $p62^{dok}$ y su asociación con SHIP y RasGAP.

Un ensayo ilustrativo para determinar la inhibición de la activación de los mastocitos inducida por FcεRI mediante los anticuerpos de la divulgación puede comprender lo siguiente: transfección de células RBL-H23 con FcγRIIB humano; sensibilización de las células RBL-H23 con IgE; la estimulación de células RBL-H23 con el fragmento $F(ab')_2$ del anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (para agregar solo FcεRI y generar la señalización mediada por FcεRI, como control) o la estimulación de células RBL-H23 con anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón, completo (para agregar FcγRIIB y FcεRI, dando lugar a la inhibición de la señalización mediada por FcεRI). Las células que hayan sido estimuladas con anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón completos además pueden incubarse previamente con los anticuerpos de la divulgación. La medición de la actividad dependiente de FcεRI de células que se han incubado previamente con los anticuerpos de la divulgación y las células que no se han incubado previamente con los anticuerpos de la divulgación y la comparación de los niveles de actividad dependiente de FcεRI en estas células, indicarían una modulación de la actividad dependiente de FcεRI por los anticuerpos de la divulgación.

El ensayo ilustrativo anteriormente descrito puede, por ejemplo, usarse para identificar anticuerpos que bloqueen la unión del ligando (IgG) al receptor FcγRIIB y antagonice la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI impidiendo la coagregación de FcγRIIB y FcεRI. Asimismo, este ensayo identifica a los anticuerpos que potencian la coagregación de FcγRIIB y FcεRI, y son agonistas de la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI, potenciando la coagregación de FcγRIIB y FcεRI.

En algunas realizaciones, los diacuerpos anti-FcγRIIB, que comprenden los dominios de unión al epítopo de los anticuerpos anti-FcγRIIB identificados, descritos en el presente documento o conocidos en la técnica, de la divulgación se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por IgE controlando y/o midiendo la desgranulación de los mastocitos o basófilos, preferentemente, en un ensayo a base de células. Preferentemente, los mastocitos o basófilos que se usan en dichos ensayos se han modificado por ingeniería para que contengan FcγRIIB humano usando métodos recombinantes convencionales conocidos por un experto en la materia. En una realización específica, los anticuerpos anti-FcγRIIB de la divulgación se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por IgE en un ensayo de liberación de β-hexosaminidasa (enzima contenida en los gránulos) a base de células. La liberación de β-hexosaminidasa a partir de los mastocitos y basófilos es un hecho principal en un estado alérgico e inflamatorio (Aketani et al. (2001) "Correlation Between Cytosolic Calcium Concentration And Degranulation In RBL-2H3 Cells In The Presence Of Various Concentrations Of Antigen- Specific IgEs", Immunol. Lett. 75: 185-189; Aketani et al. (2000) "A Screening Method For Antigen-Specific IgE Using Mast Cells Based On Intracellular Calcium Signaling", Anal. Chem. 72: 2653-2658). Se puede ensayar liberación de otros mediadores inflamatorios, incluyendo, pero sin limitación, la serotonina y la histamina para medir una respuesta mediada por IgE de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Aunque no se pretende quedar limitado a ningún mecanismo de acción en particular, la liberación de los gránulos, tales como aquellos que contienen β-hexosaminidasa a partir de los mastocitos y basófilos es un proceso que depende de la concentración de calcio intracelular, que se inicia mediante la reticulación de los FcγRI con antígenos multivalentes.

La capacidad de estudiar los mastocitos humanos se ha visto limitada por la ausencia de cultivos de mastocitos humanos apropiados a largo plazo. Recientemente, dos nuevas estirpes celulares de mastocitos humanos dependientes del factor de células madre, denominadas LAD1 y LAD2, fueron establecidas a partir de aspirados de médula ósea de un paciente con leucemia/sarcoma de mastocitos (Kirshenbaum et al. (2003) "Characterization Of Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mast Cell Lines LAD 1 And 2 Established From A Patient With Mast Cell Sarcoma/Leukemia; Activation Following Aggregation OfFcRI o FcγRI", Leukemia research, 27:677-82). Se ha descrito que ambas estirpes celulares expresan FcεRI y varios marcadores de mastocitos humanos. Las células LAD 1 y 2 pueden usarse para evaluar el efecto de los anticuerpos de la divulgación sobre las respuestas mediadas por IgE. En una realización específica, los ensayos de liberación de β-hexosaminidasa basados en células, tales como los descritos anteriormente, se pueden usar en células LAD para determinar alguna modulación de la respuesta mediadas por IgE usando los anticuerpos anti-FcγRIIB de la divulgación. En un ensayo ilustrativo, se ceban mastocitos humanos, por ejemplo, LAD 1, con IgE humana quimérica anti-nitrofenol (NP) y se les expone a BSA-NP, el antígeno polivalente y se controla la desgranulación celular midiendo la β-hexosaminidasa liberada en el sobrenadante (Kirshenbaum et al. (2003) "Characterization Of Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mast Cell Lines LAD 1 And 2 Established From A Patient With Mast Cell Sarcoma/Leukemia; Activation Following Aggregation OfFcRI o FcγRI", Leukemia research, 27:677-82).

En algunas realizaciones, si los mastocitos humanos tienen una baja expresión de FcγRIIB endógeno, determinada usando los métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, la tinción para FACS, puede ser difícil controlar y/o detectar las diferencias en la activación de la vía inhibidora mediada por los diacuerpos anti-FcγRIIB de la divulgación. Se puede regular positivamente la expresión de FcγRIIB usando citocinas y condiciones de crecimiento particulares. Se ha descrito que es posible regular positivamente a un alto nivel FcγRIIB en estirpes celulares de monocitos humanos, por ejemplo, THP1 y U937, (Tridandapani et al. (2002) "Regulated Expression And Inhibitory Function Of Fcgamma RIIB In Human Monocytic Cells", J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089) y en monocitos humanos primarios (Pricop et al. (2001) "Differential Modulation Of Stimulatory And Inhibitory Fc Gamma Receptors On Human Monocytes By Th1 And Th2 Cytokines", J. of Immunol., 166: 531-537) mediante IL4. Se ha descrito que la diferenciación de células U937 con dibutiril AMP cíclico aumenta la expresión de FcγRII (Cameron et al. (2002) "Differentiation Of The Human Monocyte Cell Line, U937, With Dibutyryl CyclicAMP Induces The Expression Of The Inhibitory Fc Receptor, FcgammaRIIB", Immunology Letters 83, 171-179). De este modo, la expresión endógena de

FcγRIIB en mastocitos humanos para usarlos en los métodos puede regularse positivamente usando citocinas, por ejemplo, IL-4, IL-13, para potenciar la sensibilidad de detección.

Los diacuerpos anti-FcγRIIB también pueden ensayarse para determinar la inhibición de la señalización mediada por el receptor de linfocitos B (BCR). La señalización mediada por BCR puede incluir al menos una o más respuestas biológicas aguas abajo, tales como la activación y proliferación de los linfocitos B, la producción de anticuerpos, etc. La coagregación de FcγRIIB y BCR produce la inhibición de la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular. Además, la coagregación de FcγRIIB y BCR conduce a la inhibición de la señalización mediada por BCR.

Específicamente, la señalización mediada por BCR comprende al menos uno o más de lo siguientes: modulación de las moléculas de señalización aguas abajo (por ejemplo, el estado de fosforilación de FcγRIIB, el reclutamiento de SHIP, la localización de Btk y/o PLCγ, la actividad MAP cinasa, el reclutamiento de Akt (señal anti-apoptótica), la movilización del calcio, la progresión del ciclo celular y la proliferación celular.

Aunque numerosas funciones efectoras de la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR están mediadas a través de SHIP, recientemente, se ha demostrado que los linfocitos B activados con lipopolisacárido (LPS) derivados de ratones deficientes en SHIP muestran una inhibición significativa de la movilización del calcio mediada por FcγRIIB, producción de $Ins(1,4,5)P_3$ y fosforilación de Erk y Akt (Brauweiler et al. (2001) "Partially Distinct Molecular Mechanisms Mediate Inhibitory FcgammaRIIB Signaling In Resting And Activated B Cells", Journal of Immunology, 167(1): 204-211). Por consiguiente, para caracterizar los anticuerpos de la divulgación, es posible usar linfocitos B *ex vivo* procedentes de ratones deficientes en SHIP. Un ensayo ilustrativo para determinar la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR por los anticuerpos de la divulgación puede comprender lo siguiente: el aislamiento de linfocitos B esplénicos de ratones deficientes en SHIP, la activación de dichos linfocitos con lipopolisacárido y la estimulación de dichos linfocitos con $F(ab')_2$ anti-IgM para agregar BCR o con anticuerpo anti-IgM para coagregar BCR con FcγRIIB. Los linfocitos que se hayan estimulado con anticuerpo anti-IgM intacto para coagregar BCR con FcγRIIB se pueden incubar previamente además con los anticuerpos de la divulgación. La actividad de células dependiente de FcγRIIB puede medirse mediante técnicas convencionales conocidas. La comparación del nivel de la actividad dependiente de FcγRIIB en células que han sido previamente incubadas con los anticuerpos, y células que no han sido previamente incubadas, y la comparación de los niveles indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIB por los anticuerpos.

La medición de la actividad dependiente de FcγRIIB puede incluir, por ejemplo, la medición de la movilización del calcio intracelular por citometría de flujo, la medición de la fosforilación de Akt y/o Erk, la medición de la acumulación de $PI(3,4,5)P_3$ mediada por BCR o la medición de la proliferación de linfocitos B mediada por FcγRIIB.

Es posible usar ensayos, por ejemplo, para identificar diacuerpos o anticuerpos anti-FcγRIIB para usarlos en la divulgación que modulen la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR bloqueando el sitio de unión al ligando (IgG) frente al receptor de FcγRIIB y antagonizando la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR impidiendo la coagregación de FcγRIIB y BCR. También se pueden usar los ensayos para identificar anticuerpos que potencien la coagregación de FcγRIIB y BCR y agonicen la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR.

Los anticuerpos anti-FcγRIIB también se pueden ensayar para determinar la señalización mediada por FcγRII en monocitos/macrófagos humanos. La coagregación de FcγRIIB con un receptor portador del motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) actúa para regular a la baja la fagocitosis mediada por FcγR usando SHIP como su efector (Tridandapani et al. (2002) "Regulated Expression And Inhibitory Function Of Fcgamma RIIB In Human Monocytic Cells", J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089). La coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB produce la rápida fosforilación del resto de tirosina en el motivo ITIM de FcγRIIB, dando lugar a una potenciación de la fosforilación de SHIP, la asociación de SHIP con Shc, y la fosforilación de proteínas que tienen un peso molecular de 120 y 60-65 kDa. Además, la coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB produce la regulación por disminución de la fosforilación de Akt, que es una serina-treonina cinasa implicada en la regulación celular y sirve para suprimir la apoptosis.

Los diacuerpos anti-FcγRIIB también pueden ensayarse para determinar la inhibición de la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos/macrófagos humanos. Por ejemplo, las células de una estirpe celular monocítica humana, THP-1 puede estimularse con fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal de ratón IV. 3 contra FcγRII y anticuerpo de cabra anti-ratón (para agregar FcγRI IA solo) o con anticuerpo monoclonal IV.3 de ratón completo y anticuerpo de cabra anti-ratón (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB). En este sistema, la modulación de las moléculas de señalización aguas abajo, tal como la fosforilación de tirosinas de FcγRIIB, la fosforilación de SHIP, la asociación de SHIP con Shc, la fosforilación de Akt y la fosforilación de proteínas que tienen un peso molecular de 120 y 60-65 kDa se puede ensayar tras la adición de moléculas de la invención a las células estimuladas. Además, la eficiencia fagocítica dependiente de FcγRIIB de la estirpe celular monocítica se puede medir directamente en presencia y ausencia de los anticuerpos de la divulgación.

Otro ensayo ilustrativo para determinar la inhibición de la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos/macrófagos humanos por los anticuerpos de la divulgación puede comprender lo siguiente: estimular las células THP-1 con el

Fab del anticuerpo anti-FcγRII de ratón IV.3 y el anticuerpo de cabra anti-ratón (para agregar solo FcγRIIA y generar la señalización mediada por FcγRIIA); o con el anticuerpo anti-FcγRII de ratón y el anticuerpo de cabra anti-ratón (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB e inhibir la señalización mediada por FcγRIIA. Las células que se han estimulado con el anticuerpo anti-FcγRII de ratón y el anticuerpo de cabra anti-ratón además se pueden incubar previamente con las moléculas de la divulgación. La medición de la actividad dependiente de FcγRIIA de células estimuladas que se han incubado previamente con moléculas de la divulgación y células que no se hayan incubado previamente con anticuerpos de la divulgación y la comparación de los niveles de actividad dependiente de FcγRIIA en estas células indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos de la divulgación.

El ensayo ilustrativo que se describe se puede usar, por ejemplo, para identificar dominios de unión que bloqueen la unión al ligando del receptor FcγRIIB y antagonicen la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA impidiendo la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA. Asimismo, este ensayo identifica los dominios de unión que potencian la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA y sean agonistas de la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

Los dominios de unión a FcγRIIB de interés se pueden ensayar al tiempo que comprenden los anticuerpos midiendo la capacidad de las células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de oveja (SRBC) opsonizados con IgG marcada con fluoresceína mediante los métodos anteriormente descritos (Tridandapani et al. (2000) "The Adapter Protein LAT Enhances Fcgamma Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells", J. Biol. Chem. 275: 20480-7). Por ejemplo, un ensayo ilustrativo para medir la fagocitosis comprende: tratar las células THP-1 con los anticuerpos de la divulgación o con un anticuerpo de control que no se una a FcγRII, comparar los niveles de actividad de dichas células, en donde la diferencia en las actividades de las células (por ejemplo, la actividad de formación de rosetas (el número de células THP-1 que se unen a SRBC recubierto con IgG), actividad de adherencia (el número total de SRBC unido a células THP-1) y la tasa fagocítica) indicarían una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos de la divulgación. Este ensayo se puede usar para identificar, por ejemplo, anticuerpos que bloqueen la unión al ligando del receptor FcγRIIB y antagonicen la inhibición mediada por FcγRIIB de la fagocitosis. Este ensayo también puede identificar anticuerpos que potencian la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

En una realización preferida, los dominios de unión modulan la actividad dependiente de FcγRIIB en monocitos/macrófagos humanos de al menos una o más de las siguientes formas: modulación de moléculas de señalización aguas abajo (por ejemplo, la modulación del estado de fosforilación de FcγRIIB, modulación de la fosforilación de SHIP, modulación de la asociación de SHIP y Shc, modulación de la fosforilación de Akt, modulación de la fosforilación de proteínas adicionales de aproximadamente 120 y 60-65 kDa) y modulación de la fagocitosis.

5.1.2 DOMINIOS DE UNIÓN A CD16A

El siguiente apartado analiza las proteínas de unión a CD16A que pueden usarse como fuentes para las regiones variables de cadena ligera y pesada para la producción de diacuerpos covalentes. En la presente divulgación, las proteínas de unión a CD16A incluyen moléculas que contienen los dominios VL y VH de los anticuerpos anti-CD16A, cuyos dominios VH y VL se usan para la producción de los diacuerpos de la presente divulgación.

Se pueden usar diversas proteínas de unión a CD16A en relación con la presente divulgación. Las proteínas de unión a CD16A adecuadas incluyen anticuerpos monoclonales humanos o humanizados, así como fragmentos de anticuerpos de unión a CD16A (por ejemplo, scFv o anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, minicuerpos) y otras proteínas de tipo anticuerpo que se unen a CD16A mediante una interacción con un dominio de región variable de cadena ligera, un dominio de región variable de cadena pesada, o ambos.

En algunas realizaciones, la unión a CD16A comprende un dominio VL y/o VH que tiene una o más CDR con secuencias procedentes de un anticuerpo anti-CD16A no humano, tal como un anticuerpo anti-CD16A de ratón, o una o más regiones marco conservadas derivadas de secuencias marco conservadas de una o más inmunoglobulinas humanas. Se conoce una serie de anticuerpos anti-CD16A no humanos de los que pueden obtenerse las CDR y otras secuencias (véase, por ejemplo, Tamm et al. (1996) "The Binding Epitopes Of Human CD16 (Fc gamma RIII) Monoclonal Antibodies. Implications For Ligand Binding", J. Imm. 157:1576-81; Fleit *et al.* (1989) pág.159; "LEUKOCYTE TYPING II: HUMAN MYELOID AND HEMATOPOIETIC CELLS", Reinherz et al., eds. Nueva York: Springer-Verlag; (1986); LEUCOCYTE TYPING III: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, McMichael A J, ed., Oxford: Oxford University Press, 1986); "LEUKOCYTE TYPING IV: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS", Kapp *et al.*, eds. Oxford Univ. Press, Oxford; "LEUKOCYTE TYPING V: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS", Schlossman *et al.*, eds. Oxford Univ. Press, Oxford; "LEUKOCYTE TYPING VI: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS", Kishimoto, ed. Taylor & Francis. Además, como se muestra en los ejemplos, se pueden obtener nuevas proteínas de unión a CD16A que reconozcan CD16A humana expresada en células usando métodos bien conocidos para la producción y selección de anticuerpos monoclonales o proteínas de unión relacionadas (por ejemplo, tecnología de hibridoma, presentación en fagos y similares). Véase, por ejemplo, O'Connell et al. (2002) "Phage Versus Phagemid Libraries For Generation Of Human Monoclonal Antibodies", J. Mol. Biol. 321:49-56; Hoogenboom et al. (2000) "Natural And Designer Binding Sites Made By Phage Display Technology", Imm. Today 21:371078; Krebs et al. (2001) "High-Throughput Generation And Engineering Of

Recombinant Human Antibodies", J. Imm. Methods 254:67-84; y otras referencias citadas en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales de una especie no humana pueden ser quimerizados o humanizados usando técnicas de humanización de anticuerpos conocidas en la técnica.

Como alternativa, es posible producir anticuerpos completamente humanos contra CD16A usando animales transgénicos que tengan elementos de un sistema inmunitario humano (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.569.825 y 5.545.806), usando células de sangre periférica humana (Casali et al. (1986) "Human Monoclonals From Antigen-Specific Selection Of B Lymphocytes And Transformation By EBV", Science 234:476-479), mediante el rastreo de una biblioteca de ADN a partir de linfocitos B humanos de acuerdo con el protocolo general que se indica en Huse et al. (1989) "Generation Of A Large Combinatorial Library Of The Immunoglobulin Repertoire In Phage Lambda", Science 246:1275-1281 y mediante otros métodos.

En una realización preferida, el donante de unión es del anticuerpo 3G8 o una versión humanizada del mismo, por ejemplo, tales como aquellos desvelados en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2004/0010124. Se contempla que, para determinados fines, puede ser ventajoso usar proteínas de unión a CD16A que se unan al receptor de CD16A en el mismo epítopo al que se une 3G8, o al menos suficientemente cerca de este epítopo para bloquear la unión por 3G8. Los métodos para lal cartografía de epítopos y los experimentos de unión competitiva para identificar proteínas de unión con las propiedades de unión deseadas son bien conocidos por los expertos en la materia de la inmunología experimental. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, citado anteriormente; Stähli et al. (1983) "Distinction Of Epitopes By Monoclonal Antibodies", Methods in Enzymology 92:242-253; Kirkland et al. (1986) "Analysis Of The Fine Specificity And Cross-Reactivity Of Monoclonal Anti-Lipid A Antibodies", J. Immunol. 137:3614-3619; Morel et al. (1988) "Monoclonal Antibodies To Bovine Serum Albumin: Affinity And Specificity Determinations", Molec. Immunol. 25:7-15; Cheung et al. (1990) "Epitope-Specific Antibody Response To The Surface Antigen Of Duck Hepatitis B Virus In Infected Ducks", Virology 176:546-552; y Moldenhauer et al. (1990) "Identity Of HML-1 Antigen On Intestinal Intraepithelial T Cells And Of B-ly7 Antigen On Hairy Cell Leukaemia", Scand. J. Immunol. 32:77-82. Por ejemplo, se puede determinar si dos anticuerpos se unen al mismo sitio usando uno de los anticuerpos para capturar el antígeno en una placa para ELISA, y luego midiendo la capacidad del segundo anticuerpo para unirse al antígeno capturado. También se puede obtener una comparación de epítopos marcando un primer anticuerpo, directa o indirectamente, con una enzima, radionúclido o fluoróforo, y midiendo la capacidad de un segundo anticuerpo no marcado para inhibir la unión del primer anticuerpo al antígeno en las células, en solución o en una fase sólida.

También es posible medir la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión del receptor de CD16A a complejos inmunitarios formados en placas para ELISA. Dichos complejos inmunitarios se forman primero recubriendo la placa con un antígeno tal como fluoresceína, luego aplicando a la placa un anticuerpo anti-fluoresceína específico. Este complejo inmunitario sirve luego como ligando para los receptores de Fc solubles, tales como sFcRIIIa. Como alternativa, es posible formar y marcar un complejo inmunitario soluble, directa o indirectamente, con una enzima, radionúclido o fluoróforo. Posteriormente, puede medirse la capacidad de los anticuerpos para inhibir la unión de estos complejos inmunitarios marcados a receptores de Fc, en solución o en una fase sólida.

Las proteínas de unión a CD16A pueden contener o no una región Fc de inmunoglobulina humana. Las regiones Fc no están presentes, por ejemplo, en las proteínas de unión a scFv. Las regiones Fc están presentes, por ejemplo, en anticuerpos IgG monoclonales tetraméricos humanos o humanizados. Como se ha descrito anteriormente, en algunas realizaciones de la presente divulgación, la proteína de unión a CD16A incluye una región Fc que tiene una función efectora modificada, por ejemplo, afinidad reducida por un ligando efector tal como un receptor de Fc o componente C1 del complemento en comparación con la región Fc no modificada (por ejemplo, el fragmento Fc de las proteínas IgG1 naturales). En una realización, la región Fc no está glicosilada en el aminoácido de la región Fc correspondiente a la posición 297. Dichos anticuerpos carecen de la función efectora de Fc.

Por lo tanto, la proteína de unión a CD16A puede no presentar unión mediada por Fc a un ligando efector, tal como un receptor de Fc o el componente C1 del complemento debido a la ausencia del dominio Fc en la proteína de unión mientras, en otros casos, la falta de unión o la función efectora se debe a una alteración de la región constante del anticuerpo.

5.1.2.1 Proteínas de unión a CD16A que comprenden secuencias CDR similares a las secuencias CDR de un mAb 3G8.

Las proteínas de unión a CD16A que pueden usarse en la práctica de la divulgación incluyen proteínas que comprenden una secuencia CDR derivada de (es decir, que tiene una secuencia igual o similar a) las CDR del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8. Los ADNc complementarios que codifican las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo monoclonal 3G8 de ratón, incluyendo las secuencias que codifican CDR, se clonaron y secuenciaron como se describe. Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de 3G8 se proporcionan más adelante. Usando la región variable y las secuencias CDR de ratón, se produjo y analizó las propiedades de un gran número de anticuerpos monoclonales humanizados, que comprenden regiones determinantes de la complementariedad derivadas de las CDR de 3G8. Para identificar los anticuerpos humanizados que se unen a

CD16A con alta afinidad y que tienen otras propiedades deseables, se produjeron cadenas pesadas del anticuerpo que comprendía una región VH con las CDR derivadas de 3G8 y se combinaron (por coexpresión) con las cadenas ligeras del anticuerpo que comprendían una región VL con las CDR derivadas de 3G8 para producir un anticuerpo tetramérico para el análisis. Las propiedades de los anticuerpos tetraméricos resultantes se determinaron como se describe más adelante. Como se describe a continuación, las proteínas de unión a CD16A que comprenden CDR de 3G8, tales como las proteínas de anticuerpos humanizados que se describen en el presente documento, pueden usarse de acuerdo con la divulgación.

5.1.2.1.1 Región VH

La proteína de unión a CD16A puede comprender un dominio variable de cadena pesada en el que al menos una CDR (y normalmente tres CDR) tienen la secuencia de una CDR (y más comúnmente las tres CDR) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8 y para el que las partes restantes de la proteína de unión sean esencialmente humanas (derivadas de y esencialmente similares a la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o anticuerpos humanos).

También se describe un anticuerpo 3G8 humanizado o un fragmento de anticuerpo que contiene CDR derivadas del anticuerpo 3G8 en un armazón sustancialmente humano, pero en el que al menos una de las CDR del dominio variable de cadena pesada difiere en la secuencia con respecto a la CDR de cadena pesada del anticuerpo de ratón 3G8 correspondiente. Por ejemplo, en una realización, la/s CDR difiere/n de la secuencia de las CDR de 3G8 al menos en que tienen una o más sustituciones de CDR que en la técnica se ha demostrado que afectan a la unión de 3G8 a CD16A, como se conoce en la técnica o como se describe en las Tablas 3 y 4A-H. Las proteínas de unión a CD16 adecuadas pueden comprender 0, 1, 2, 3 o 4, o más de estas sustituciones (y con frecuencia tienen de 1 a 4 de estas sustituciones) y opcionalmente también pueden tener sustituciones adicionales.

Tabla 3. Sustituciones del dominio de V_H

n.º	Posición de Kabat	Región	Sustituciones
1	2	FR1	Ile
2	5	FR1	Lys
3	10	FR1	Thr
4	30	FR1	Arg
5	34	CDR1	Val
6	50	CDR2	Leu
7	52	CDR2	Phe o Tyr o Asp
8	54	CDR2	Asn
9	60	CDR2	Ser
10	62	CDR2	Ser
11	70	FR3	Thr
12	94	FR3	Gln o Lys o Ala o His
13	99	CDR3	Tyr
14	101	CDR3	Asp

Tabla 4A. Secuencias de V_H derivadas de V_H de 3G8*

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VH	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VH	A	A	A	A	A	A	B
HxC	B	A	B	A	A	A	B
CxH	A	A	A	A	B	A	B

(continuación)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3G8VH-1	B	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-2	C	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-3	D	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-4	B	A	B	A	C	B	B
Hu3G8VH-5	B	A	B	A	C	A	B
Hu3G8VH-6	B	B	B	A	B	B	B
Hu3G8VH-7	B	B	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-8	B	A	B	A	B	C	B
Hu3G8VH-9	B	A	B	B	B	B	B
Hu3G8VH-10	B	A	B	A	B	B	B
Hu3G8VH-11	B	A	B	B	B	A	B
Hu3G8VH-12	B	A	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-13	B	A	B	D	B	A	B
Hu3G8VH-14	B	A	B	E	B	A	B
Hu3G8VH-15	B	A	B	A	D	A	B
Hu3G8VH-16	B	A	B	A	E	A	B
Hu3G8VH-17	B	A	B	A	F	A	B
Hu3G8VH-18	B	A	B	A	G	A	B
Hu3G8VH-19	B	A	B	A	C	C	B
Hu3G8VH-20	B	B	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-21	B	A	B	A	D	B	B
Hu3G8VH-22	B	B	B	C	B	C	B
Hu3G8VH-23	B	B	B	C	E	C	B
Hu3G8VH-24	B	B	B	C	F	C	B
Hu3G8VH-25	B	B	B	C	G	C	B
Hu3G8VH-26	B	B	B	C	C	C	B
Hu3G8VH-27	B	B	B	C	E	D	B
Hu3G8VH-28	B	B	B	C	F	D	B
Hu3G8VH-29	B	B	B	C	G	D	B
Hu3G8VH-30	B	B	B	C	C	D	B
Hu3G8VH-31	E	B	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-32	E	B	B	H	B	A	B
Hu3G8VH-33	E	B	B	H	B	A	B
Hu3G8VH-34	E	B	B	C	B	C	B
Hu3G8VH-35	E	B	B	C	C	C	B
Hu3G8VH-36	E	B	B	H	C	D	B
Hu3G8VH-37	E	B	B	H	E	C	B

(continuación)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3G8VH-38	E	B	B	F	B	A	B
Hu3G8VH-39	E	B	B	I	B	A	B
Hu3G8VH-40	E	B	B	G	B	A	B
Hu3G8VH-41	E	B	B	J	B	A	B
Hu3G8VH-42	E	B	B	C	H	A	B
Hu3G8VH-43	E	B	B	C	H	C	B
Hu3G8VH-44	E	B	B	C	I	D	B
Hu3G8VH-45	E	B	B	C	J	D	B
*Las letras de la Tabla 4A se refieren a las secuencias de las Tablas 4 B-H.							

TABLA 4B: FR1

A	B	C	D	E		RESTO
Q	Q	Q	Q	Q		1
V	V	V	V	I		2
T	T	T	T	T		3
L	L	L	L	L		4
K	R	K	R	K		5
E	E	E	E	E		6
S	S	S	S	S		7
G	G	G	G	G		8
P	P	P	P	P		9
G	A	A	A	T		10
I	L	L	L	L		11
L	V	V	V	V		12
Q	K	K	K	K		13
P	P	P	P	P		14
S	T	T	T	T		15
Q	Q	Q	Q	Q		16
T	T	T	T	T		17
L	L	L	L	L		18
S	T	T	T	T		19
L	L	L	L	L		20
T	T	T	T	T		21
C	C	C	C	C		22
S	T	T	T	T		23
F	F	F	F	F		24
S	S	S	S	S		25

(continuación)

A	B	C	D	E		RESTO
G	G	G	G	G		26
F	F	F	F	F		27
S	S	S	S	S		28
L	L	L	L	L		29
R	S	S	R	S		30
103	104	105	106	107		SEQ ID NO.

SEQ ID NO.	Secuencia
103	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLR
104	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
105	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
106	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLR
107	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLS

TABLA 4C: CDR1

A	B		RESTO
T	T		31
S	S		32
G	G		33
M	V		34
G	G		35
V	V		35A
G	G		35B
108	109		SEQ ID NO.

SEQ ID NO.	Secuencia
108	TSGMGVG
109	TSGVGVG

TABLA 4D: FR2

A	B		RESTO
W	W		36
I	I		37
R	R		38
Q	Q		39
P	P		40
S	P		41

(continuación)

A	B		RESTO
G	G		42
K	K		43
G	A		44
L	L		45
E	E		46
W	W		47
L	L		48
A	A		49
110	111		SEQ ID NO.

SEQ ID NO.	Secuencia
110	WIRQPSGKGLEWLA
111	WIRQPPGKALEWLA

TABLA 4E: CDR2

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	RESTO
H	H	H	H	H	L	H	L	H	L	50
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	51
W	Y	W	Y	W	D	F	W	D	W	52
W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	53
D	N	D	D	N	D	D	D	D	N	54
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	55
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	56
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	57
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	58
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	59
N	N	S	N	N	S	S	S	S	S	60
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	61
A	A	S	A	A	S	S	S	S	S	62
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	63
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	64
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	65
112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	SEQ ID NO

SEQ ID NO.	Secuencia
112	HIWWDDDKRYNPALKS
113	HIYWNDDKRYNPALKS
114	HIWWDDDKRYSPSLKS

(continuación)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	RESTO
SEQ ID NO.	Secuencia									
115	HIYWDDDKRYNPALKS									
116	HIWWNDDKRYNPALKS									
117	LIDWDDDKRYSPSLKS									
118	HIFWDDDKRYSPSLKS									
119	LIWWDDDKRYSPSLKS									
120	HIDWDDDKRYSPSLKS									
121	LIWWNDDKRYSPSLKS									

TABLA 4F: FR3

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	RESTO
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	66
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	67
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	68
I	1	1	I	I	I	1	1	I	I	69
S	S	S	s	s	s	s	T	T	T	70
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	71
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	72
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	73
s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	74
s	K	K	K	K	K	K	K	K	K	75
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	76
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	77
V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	78
F	V	V	V	V	V	V	V	V	V	79
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	80
K	T	T	T	T	T	T	T	T	T	81
I	M	M	M	M	M	M	M	M	M	82
A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	82A
S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	82B
V	M	M	M	M	M	M	M	M	M	82C
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	83
T	P	P	P	P	P	P	P	P	P	84
A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	85
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	86
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	87
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	88
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	89
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	90
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	91
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	92

(continuación)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	RESTO
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	93
Q	R	0	T	K	A	H	R	H	Q	94
122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	82 SEQ ID NO.
132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	82A SEQ ID NO.
142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	82B SEQ ID NO.
152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	82C SEQ ID NO.

SEQ ID NO.	Secuencia
122	RLTISKDTSSNQVFLKIDTADTATYYCAQ
123	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
124	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
125	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAT
126	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAK
127	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAA
128	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
129	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
130	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
131	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
132	RLTISKDTSSNQVFLKADTADTATYYCAQ
133	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAR
134	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAQ
135	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAT
136	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAK
137	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAA
138	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAH
139	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAR
140	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAH
141	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAQ
142	RLTISKDTSSNQVFLKSDTADTATYYCAQ
143	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAR
144	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAQ
145	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAT
146	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAK
147	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAA

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia
148	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAH
149	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAR
150	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAH
151	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAQ
152	RLTISKDTSSNQVFLKVDTADTATYYCAQ
153	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
154	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
155	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAT
156	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAK
157	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAA
158	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
159	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
160	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
161	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ

TABLA 4G: CDR3

A	B	C	D	RESTO
I	I	I	I	95
N	N	N	N	96
P	P	P	P	97
A	A	A	A	98
W	W	Y	Y	99
F	F	F	F	100
A	D	A	D	101
Y	Y	Y	Y	102
162	163	164	165	SEQ ID NO

SEQ ID NO.	Secuencia
162	INPAWFAY
163	INPAWFDY
164	INPAYFAY
165	INPAYFDY

TABLA 4H: FR4

A	B		RESTO
W	W		103
G	G		104
Q	Q		105
G	G		106
T	T		107
L	L		108
V	V		109
T	T		110
V	V		111
S	S		112
A	S		113
166	167		SEQ ID NO

SEQ ID NO.	Secuencia
166	WGQGTLVTVSA
167	WGQGTLVTVSS

En una realización, la proteína de unión a CD16A puede contener una secuencia del dominio variable de cadena pesada que es igual que el, o similar al, dominio VH de la construcción Hu3G8VH-1, cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO: 68. Por ejemplo, la descripción proporciona una proteína de unión a CD16A que comprende un dominio VH con una secuencia que (1) difiere del dominio de VH de Hu3G8VH-1 (SEQ ID NO: 68) en cero, una o más de una de las sustituciones de CDR establecidas en la tabla 1; (2) difiere del dominio VH de la construcción Hu3G8VH-1 en cero, una o más de una de las sustituciones de región marco conservada como se establece en la tabla 1; y (3) es al menos aproximadamente un 80 % idéntica, a menudo idéntica en al menos aproximadamente el 90 %, y a veces idéntica en al menos aproximadamente el 95 %, o incluso idéntica en al menos aproximadamente el 98 % a la secuencia VH de Hu3G8VH-1 en las posiciones restantes.

Los dominios VH ilustrativos de las proteínas de unión a CD16 tienen la secuencia de 3G8VH, Hu3G8VH-5 y Hu3G8VH-22 (SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70, respectivamente). Las secuencias de nucleótidos ilustrativas que codifican las secuencias de 3G8VH y Hu3G8VH-5 (SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 69, respectivamente) se proporcionan mediante la SEQ ID NO: 80 y la SEQ ID NO: 81, respectivamente.

El dominio VH puede tener una secuencia que difiere de la de la construcción Hu3G8VH-1 (SEQ ID NO: 68) en al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro 4, al menos cinco o al menos seis de las sustituciones que se muestran en la tabla 3. Se cree que estas sustituciones dan lugar a una mayor afinidad por CD16A y/o reducen la inmunogenicidad de una proteína de unión a CD16A cuando se administra a seres humanos. En determinadas realizaciones, el grado de identidad de secuencia con el dominio VH de Hu3G8VH-1 en el resto de las posiciones es de al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 98 %.

A modo ilustrativo y no limitante, en la tabla 4 se muestran las secuencias de una serie de dominios VH de proteína de unión a CD16A. Las cadenas pesadas que comprenden estas secuencias fusionadas a una región constante de Cγ1 humana se coexpresaron con la cadena ligera de la construcción hu3G8VL-1 (descrita más adelante) para formar los anticuerpos tetraméricos, y la unión de los anticuerpos a CD16A se midió para evaluar el efecto de las sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio VH de hu3G8VH-1. Las construcciones en las que el dominio VH tiene una secuencia de hu3G8VH-1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 42, 43, 44 y 45 mostraron una alta afinidad de unión, mostrando unión intermedia los dominios VH de hu3G8VH-6 y -40. Se considera que tienen propiedades de unión particularmente favorables las proteínas de unión a CD16A que comprenden los dominios VH de las construcciones hu3G8VH-5 y hu3G8VH-22 (SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70, respectivamente).

5.1.2.2 Región VL

Se realizaron estudios similares para identificar las secuencias del dominio variable de cadena ligera con propiedades de unión favorables. También se describe una proteína de unión a CD16A que contiene un dominio variable de cadena ligera en el que al menos una CDR (y, normalmente, las tres CDR) tienen la secuencia de una CDR (y más comúnmente las tres CDR) de cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8 y para el que las partes restantes de la proteína de unión son esencialmente humanas (derivadas de y esencialmente similares a, la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o anticuerpos humanos).

También se describe un fragmento de un anticuerpo 3G8 humanizado que contiene las CDR derivadas del anticuerpo 3G8 en una región marco conservada esencialmente humana, pero en el que al menos una de las CDR del dominio variable de cadena ligera difiere en secuencia con respecto a la CDR de cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8. En una realización, la/s CDR difiere/n de la secuencia de 3G8 teniendo al menos una o más sustituciones de aminoácidos en una CDR, tales como, una o más sustituciones mostradas en la tabla 2 (por ejemplo, arginina en la posición 24 de la CDR1; serina en la posición 25 de la CDR1; tirosina en la posición 32 de la CDR1; leucina en la posición 33 de la CDR1; ácido aspártico, triptófano o serina en la posición 50 de la CDR2; serina en la posición 53 de la CDR2; alanina o glutamina en la posición 55 de la CDR2; treonina en la posición 56 de la CDR2; serina en la posición 93 de la CDR3; y/o treonina en la posición 94 de la CDR3). En diversas realizaciones, el dominio variable puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas sustituciones (y a menudo tienen de 1 a 4 de estas sustituciones) y, opcionalmente, pueden tener también otras sustituciones.

En una realización, la proteína de unión a CD16A adecuada puede contener una secuencia del dominio variable de cadena ligera que es igual que o similar al, la construcción del dominio VL de Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71), cuya secuencia se proporciona en la tabla 6. Por ejemplo, la invención proporciona una proteína de unión a CD16A que comprende un dominio VL con una secuencia que (1) difiere del dominio VL de la construcción Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71) en cero, una o más de las sustituciones de CDR que se exponen en la tabla 5; (2) difiere del dominio VL de la construcción Hu3G8VL-1 en cero, una o más de las sustituciones de región marco conservada que se exponen en la tabla 5; y (3) es al menos aproximadamente un 80 % idéntica, frecuentemente al menos aproximadamente un 90 % y en ocasiones hasta aproximadamente un 95 % idéntica o incluso hasta al menos aproximadamente un 98 % idéntica a la secuencia VH de Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71) en el resto de las posiciones.

Tabla 5. Sustituciones del dominio V_L de 3G8

n.º	Posición de Kabat	Región	Sustituciones
1	24	CDR1	Arg
2	25	CDR1	Ser
3	32	CDR1	Tyr
4	33	CDR1	Leu
5	50	CDR2	Asp o Trp o Ser
6	51	CDR2	Ala
7	53	CDR2	Ser
8	55	CDR2	Ala o Gln
9	56	CDR2	Thr
10	93	CDR3	Ser
11	94	CDR3	Thr

Tabla 6. Secuencias de V_L derivadas de V_L de 3G8*

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Hu3G8VL-1	B	A	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-2	B	B	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-3	B	C	A	A	B	A	B

(continuación)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3G8VL-4	B	D	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-5	B	E	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-6	B	F	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-7	B	G	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-8	B	A	A	B	B	A	B
Hu3G8VL-9	B	A	A	C	B	A	B
Hu3G8VL-10	B	A	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-11	B	A	A	E	B	A	B
Hu3G8VL-12	B	A	A	F	B	A	B
Hu3G8VL-13	B	A	A	G	B	A	B
Hu3G8VL-14	B	A	A	A	B	B	B
Hu3G8VL-15	B	A	A	A	B	C	B
Hu3G8VL-16	B	A	A	A	B	D	B
Hu3G8VL-17	B	A	A	A	B	E	B
Hu3G8VL-18	B	B	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-19	B	B	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-20	B	B	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-21	B	C	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-22	B	C	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-23	B	C	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-24	B	D	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-25	B	D	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-26	B	D	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-27	B	E	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-28	B	E	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-29	B	E	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-30	B	A	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-31	B	A	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-32	B	A	A	H	B	A	B
Hu3G8VL-33	B	A	A	I	B	A	B
Hu3G8VL-34	B	A	A	J	B	A	B
Hu3G8VL-35	B	B	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-36	B	C	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-37	B	E	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-38	B	B	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-39	B	C	A	I	B	D	B

(continuación)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3G8VL-40	B	E	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-41	B	B	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-42	B	C	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-43	B	E	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-44	B	A	A	K	B	A	B
*Las letras de la tabla 6A se refieren a las secuencias de las tablas 6B-H.							

TABLA 6B:FR1

A	B	RESTO
D	D	1
T	I	2
V	V	3
L	M	4
T	T	5
Q	Q	6
S	S	7
P	P	8
A	D	9
S	S	10
L	L	11
A	A	12
V	V	13
S	S	14
L	L	15
G	G	16
Q	E	17
R	R	18
A	A	19
T	T	20
I	I	21
S	N	22
C	C	23
168	169	SEQ ID NO
SEQ ID NO.	Secuencia	
168	DTVLTQSPASLAVSL	
169	DIVMTQSPDSLAVSL	

TABLA 6C: CDR1

A	B	C	D	E	F	G	RESTO
K	R	K	K	K	K	K	24
A	A	S	A	A	A	A	25
S	S	S	S	S	S	S	26
O	O	O	O	O	O	O	27
S	S	S	S	S	S	S	27A
V	V	V	V	V	V	V	27B
D	D	D	D	D	D	D	27C
F	F	F	F	F	F	F	27D
D	D	D	D	D	D	D	28
G	G	G	G	G	G	G	29
D	D	D	D	D	D	D	30
S	S	S	S	S	S	S	31
F	F	F	Y	F	F	Y	32
M	M	M	M	L	M	L	33
N	N	N	N	N	A	A	34
170	171	172	173	174	175	176	27 SEQ ID NO
177	178	179	180	181	182	183	27A SEQ ID NO
184	185	186	187	188	189	190	27B SEQ ID NO
191	192	193	194	195	196	197	27C SEQ ID NO
198	199	200	201	202	203	204	27D SEQ ID NO

SEQ ID NO.	Secuencia
170	KASQDGDSFMN
171	RASQDGDSFMN
172	KSSQDGDSFMN
173	KASQDGDSYMN
174	KASQDGDSFLN
175	KASQDGDSFMA
176	KASQDGDSYLA
177	KASSDGDSFMN
178	RASSDGDSFMN
179	KSSSDGDSFMN
180	KASSDGDSYMN
181	KASSDGDSFLN
182	KASSDGDSFMA
183	KASSDGDSYLA
184	KASVDGDSFMN
185	RASVDGDSFMN
186	KSSVDGDSFMN

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia
187	KASVDGDSYMN
188	KASVDGDSFLN
189	KASVDGDSFMA
190	KASVDGDSYLA
191	KASDDGDSFMN
192	RASDDGDSFMN
193	KSSDDGDSFMN
194	KASDDGDSYMN
195	KASDDGDSFLN
196	KASDDGDSFMA
197	KASDDGDSYLA
198	KASFDGDSFMN
199	RASFDGDSFMN
200	KSSFDGDSFMN
201	KASFDGDSYMN
202	KASFDGDSFLN
203	KASFDGDSFMA
204	KASFDGDSYLA

SEQ ID NO.	Secuencia
193	KSSDDGDSFMN
194	KASDDGDSYMN
195	KASDDGDSFLN
196	KASDDGDSFMA
197	KASDDGDSYLA
198	KASFDGDSFMN
199	RASFDGDSFMN
200	KSSFDGDSFMN
201	KASFDGDSYMN
202	KASFDGDSFLN
203	KASFDGDSFMA
204	KASFDGDSYLA

TABLA 6D: FR2

A	RESTO
W	35
Y	36
Q	37
Q	38

(continuación)

A	RESTO
K	39
P	40
G	41
Q	42
P	43
P	44
K	45
L	46
L	47
I	48
Y	49
205	SEQ ID NO
SEQ ID NO.	Secuencia
205	WYQQKAPGQPPKLLIY

TABLA 6E: CDR2

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	RESTO
T	D	W	T	D	D	S	S	S	T	T	50
T	A	A	T	A	A	A	T	T	T	T	51
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	52
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	53
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	54
E	E	E	E	E	A	Q	E	Q	Q	Q	55
S	S	S	T	T	T	S	S	S	S	S	56
206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	SEQ ID NO

SEQ ID NO.	Secuencia
206	TTSNLES
207	DASNLES
208	WASNLES
209	TTSNLET
210	DASNLET
211	DASNLAT
212	SASNLQS
213	STSNLES
214	STSNLQS
215	TTSNLQS
216	TTSSLQS

TABLA 6F: FR3

A	B	RESTO
G	G	57
I	V	58
P	P	59
A	D	60
R	R	61
F	F	62
S	S	63
A	G	64
S	S	65
G	G	66
S	S	67
G	G	68
T	T	69
D	D	70
F	F	71
T	T	72
L	L	73
N	T	74
I	I	75
H	S	76
P	S	77
V	L	78
E	Q	79
E	A	80
E	E	81
D	D	82
T	V	83
A	A	84
T	V	85
Y	Y	86
Y	Y	87
C	C	88
217	218	SEQ ID NO

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia
217	GIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC
218	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC

TABLA 6G: CDR3

A	B	C	D	E	RESTO
Q	Q	Q	Q	Q	89
Q	Q	Q	Q	Q	90
S	S	S	S	S	91
N	Y	Y	N	N	92
E	S	E	S	E	93
D	T	D	D	T	94
P	P	P	P	P	95
Y	Y	Y	Y	Y	96
T	T	T	T	T	97
219	220	221	222	223	SEQ ID NO

SEQ ID NO.	Secuencia
219	QQSNEDPYT
220	QQSYSTPYT
221	QQSYEDPYT
222	QQSNSDPYT
223	QQSNETPYT

TABLA 6H: FR4

A	B	RESTO
F	F	98
G	G	99
G	Q	100
G	G	101
T	T	102
K	K	103
L	L	104
E	E	105
I	I	106
K	K	107
224	225	SEQ ID NO

(continuación)

SEQ ID NO	Secuencia
224	FGGGTKLEIK
225	FGQGTKLEIK

Los dominios VL ilustrativos de las proteínas de unión a CD16 tienen la secuencia de 3G8VL, Hu3G8VL-1 o Hu3G8VL-43, (SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72, respectivamente) como se muestra en las tablas 5 y 6. Las secuencias de nucleótidos ejemplares que codifican 3G8VL (SEQ ID NO: 82) y Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71) se proporcionan en la SEQ ID NO: 83 y la SEQ ID NO: 84, respectivamente.

El dominio VL puede tener una secuencia que difiere de la construcción Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71) en cero, uno, al menos dos, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8 o al menos 9 de las sustituciones que se muestran en la Tabla 2. Se cree que estas sustituciones dan lugar a una mayor afinidad por CD16A y/o reducen la inmunogenicidad de una proteína de unión a CD16A cuando se administra a seres humanos. En determinadas realizaciones, el grado de identidad de las secuencias en las posiciones restantes es de al menos aproximadamente el 80 %, de al menos aproximadamente el 90 %, de al menos aproximadamente el 95 % o de al menos aproximadamente el 98 %.

A modo ilustrativo y no limitante, las secuencias de varios dominios VL de las proteínas de unión a CD16A se muestran en la tabla 6. Las cadenas ligeras que comprenden estas secuencias fusionadas a un dominio constante Cκ humano se coexpresaron con una cadena pesada de Hu3G8VH (anteriormente descrita) para formar anticuerpos tetraméricos, y la unión de los anticuerpos a CD16A se midió para evaluar el efecto de las sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio VL de la construcción Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71). Las construcciones en las que el dominio VL tiene una secuencia de hu3G8VL-1, 2, 3, 4, 5, 10, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 27, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 42 mostraron una alta afinidad de unión y hu3G8VL-15, 17, 20, 23, 25, 26, 29, 30, 31, 38, 39, 40 y 41 mostraron una unión intermedia. Las proteínas de unión a CD16A que comprenden los dominios VL de las construcciones hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 y hu3G8VL-43 se considera que tienen propiedades de unión particularmente favorables (SEQ ID NO:71, SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 72, respectivamente).

5.1.2.2.1 Combinaciones de los dominios VL y/o VH

Como se sabe en la técnica y se describe en otra parte del presente documento, las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina pueden expresarse mediante métodos recombinantes en condiciones en las que estas se asocian para producir un diacuerpo, o también pueden combinarse *in vitro*. De este modo, se apreciará que se puede combinar un dominio VL derivado de 3G8 descrito en el presente documento con un dominio VH derivado de 3G8 descrito en el presente documento para producir un diacuerpo de unión a CD16A, y se contemplan todas estas combinaciones.

A modo ilustrativo, y no como limitación, los ejemplos de los diacuerpos de CD16A útiles son aquellos que comprenden al menos un dominio VH y al menos un dominio VL, en los que el dominio VH es de hu3G8VH-1, hu3G8VH-22 o hu3G8VH-5 (SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 69, respectivamente) y el dominio VL es de hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 o hu3G8VL-43 (SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 41, respectivamente). En particular, los anticuerpos humanizados que comprenden hu3G8VH-22 (SEQ ID NO: 22) y, hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 o hu3G8VL-43 (SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 72, respectivamente) o hu3G8VH-5 (SEQ ID NO: 69) y hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71) tienen propiedades favorables.

Los expertos en la materia apreciarán que las secuencias de los dominios VL y VH descritos en el presente documento además pueden modificarse usando los métodos conocidos en la técnica, tales como maduración por afinidad (Véase Schier et al. (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site", J. Mol. Biol. 263:551-567; Daugherty et al. (1998) "Antibody Affinity Maturation Using Bacterial Surface Display", Protein Eng. 11:825-832; Boder et al. (1997) "Yeast Surface Display For Screening Combinatorial Polypeptide Libraries", Nat. Biotechnol. 15:553-557; Boder et al. (2000) "Directed Evolution Of Antibody Fragments With Monovalent Femtomolar Antigen-Binding Affinity", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10701-10705; Hudson et al. (2003) "Engineered Antibodies", Nature Medicine 9:129-39). Por ejemplo, las proteínas de unión a CD16A pueden modificarse usando técnicas de maduración por afinidad con el fin de identificar proteínas con mayor afinidad por CD16A y/o menor afinidad por CD16B.

Una proteína de unión a CD16 ilustrativa es el anticuerpo 3G8 de ratón. La secuencia de aminoácidos que comprende los dominios VH y VL del anticuerpo 3G8 humanizado se describe en las FIG. 2, 9, 14 y se expone en las SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72.

5.2 DIACUERPOS QUE COMPRENDEN REGIONES Fc O PARTES DE LAS MISMAS

Se describen moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc o porciones de los mismos (por ejemplo, un dominio CH2 o CH3). En determinadas realizaciones, el dominio Fc, o la/s parte/s de los mismos, comprenden uno o más dominios constantes de la región Fc de IgG2, IgG3 o IgG4 (por ejemplo, CH2 o CH3). También se describen moléculas que comprenden un dominio Fc o una porción del mismo, en donde el dominio Fc o parte del mismo comprende al menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, sustitución) con respecto a un dominio Fc de tipo silvestre equivalente o parte del mismo. Los dominios Fc variantes son bien conocidos en la técnica y se usan principalmente para modificar el fenotipo del anticuerpo que comprende dicho dominio Fc variante evaluado mediante ensayos de la actividad de unión o la función efectora bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISA, análisis SPR o ADCC. Dichos dominios Fc variantes o partes de los mismos, pueden conferir o modificar la función efectora mostrada por una molécula de diacuerpo descrita en el presente documento que comprende un dominio Fc (o una porción del mismo) como se evalúa funcionalmente, por ejemplo, en un ensayo dependiente de los linfocitos NK o dependiente de macrófagos. Las variantes del dominio Fc identificadas como modificadoras de la función efectora se desvelan en la solicitud internacional WO04/063351, las publicaciones de solicitudes de patente de los Estados Unidos 2005/0037000 y 2005/0064514 y las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2006-0134709 A1, presentada el 10 de noviembre de 2005 y 2006-0177439 A1, presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitudes concurrentes de los inventores.

También se describe el uso de cualquier variante de Fc conocida en la técnica, tales como las desveladas en Duncan et al. (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG", Nature 332:563-564; Lund et al. (1991) "Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG", J. Immunol. 147:2657-2662; Lund et al. (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma RII", Mol. Immunol. 29:53-59; Alegre et al. (1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties *In Vivo*", Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al. (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H", Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92:11980-11984; Jefferis et al. (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation", Immunol. Lett. 44:111-117; Lund et al. (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors", FASEB J. 9:115-119; Jefferis et al. (1996) "Modulation Of Fc (Gamma) R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions", Immunol. Lett. 54:101-104; Lund et al. (1996) "Multiple Interactions Of Igg With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains", J. Immunol. 157:4963-4969; Armour et al. (1999) "Recombinant Human IgG Molecules Lacking Fcgamma Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities", Eur. J. Immunol. 29:2613-2624; Idusogie et al. (2000) "Mapping Of The C1Q Binding Site On Rituxan", A Chimeric Antibody With A Human IgG1 Fc", J. Immunol. 164:4178-4184; Reddy et al. (2000) "Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4", J. Immunol. 164:1925-1933; Xu et al. (2000) "*In Vitro* Characterization Of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies", Cell. Immunol. 200:16-26; Idusogie et al. (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement", J. Immunol. 166:2571-2575; Shields et al. (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc gamma RI", Fc gamma RII, Fc gamma RIII, And FcRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc gamma R", J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Jefferis et al. (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcgammaR: Current Models", Immunol. Lett. 82:57-65; Presta et al. (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function", Biochem. Soc. Trans. 30:487-490); documentos US 5.624.821; US 5.885.573; US 6.194.551; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572.

En determinadas realizaciones, dichas una o más modificaciones a los aminoácidos de la región Fc disminuyen la afinidad y la avidez de la región Fc y, por lo tanto, la molécula de diacuerpo descrita, por uno o más receptores FcγR. También se describen diacuerpos que comprenden una variante de la región Fc o parte de la misma, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos con respecto a una región Fc de tipo silvestre, uniéndose dicha región Fc variante solo a un FcγR, en donde dicho FcγR es FcγRIIIA. Como alternativa, los diacuerpos pueden comprender una región Fc variante o una parte de la misma, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos con respecto a una región Fc de tipo silvestre, uniéndose dicha región Fc variante solo a un FcγR, en la que dicho FcγR es FcγRIIA. Como alternativa, los diacuerpos pueden comprender una región Fc variante o una porción de la misma, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos con respecto a una región Fc de tipo silvestre, uniéndose dicha región Fc variante solo a un FcγR, en donde dicho FcγR es FcγRIIB. También se describen moléculas que comprenden un dominio Fc variante, en donde la variante confiere o media en la actividad aumentada de ADCC y/o una unión aumentada a FcγRIIA (CD32A), con respecto a una molécula que no comprende dominio Fc o que comprende un dominio Fc de tipo silvestre, medido usando los métodos conocidos por los expertos en la materia y descritos en el presente documento. Como alternativa, las moléculas pueden comprender un dominio Fc variante, en donde la variante confiere o media en la actividad disminuida de ADCC (u otra función efectora) y/o unión aumentada a FcγRIIB (CD32B), con respecto a una molécula que no comprende dominio Fc o que comprende un dominio Fc de tipo silvestre, medido usando los métodos conocidos por los expertos en la materia y descritos en el presente documento.

La invención también engloba el uso de un dominio Fc que comprende dominios o regiones de dos o más isotipos de IgG. Como se conoce en la técnica, la modificación de aminoácidos de la región Fc puede afectar profundamente a la función efectora y/o a la actividad de unión mediada por el fragmento Fc. Sin embargo, estas modificaciones en las características funcionales además pueden perfeccionarse y/o manipularse por ingeniería cuando se ponen en práctica en el contexto de los isotipos IgG seleccionados. De forma análoga, las características naturales del segmento Fc del isotipo pueden manipularse mediante una o más modificaciones de aminoácidos. Los múltiples isotipos de IgG (es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) presentan diferentes propiedades físicas y funcionales incluyendo la semivida en suero, la fijación del complemento, afinidades de unión a FcγR y actividades de función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC) debido a las diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus dominios bisagra y/o Fc. En determinadas realizaciones, la modificación de aminoácidos y la región Fc de IgG se seleccionan independientemente en función de sus respectivas actividades de función de enlace efectora por separado para diseñar un diacuerpo con las características deseadas. En la mayoría de las realizaciones, dichas modificaciones de aminoácidos y las regiones bisagra/Fc de IgG se ensayado por separado para determinar su actividad de unión y/o función efectora como se describe en el presente documento o como se sabe en la técnica en el contexto de una IgG1. En determinadas realizaciones, dicha modificación de aminoácidos y región bisagra/Fc de la IgG presentan funcionalidad similares, por ejemplo, mayor afinidad por FcγRIIA, cuando se ensayan por separado para determinar la unión a FcγR o la función efectora en el contexto de la molécula de diacuerpo u otra molécula que contenga Fc (por ejemplo, una inmunoglobulina). La combinación de dicha modificación de aminoácidos y la región Fc de la IgG seleccionada actúan entonces de manera aditiva o, más preferentemente, de manera sinérgica para modificar dicha funcionalidad de la molécula de diacuerpo de la divulgación, con respecto a una molécula de diacuerpo de la divulgación que comprende una región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones, dicha modificación de aminoácidos y la región Fc de la IgG presentan funcionalidades opuestas, por ejemplo, mayor o menor, respectivamente, afinidad por FcγRIIA, cuando se ensayan por separado para determinar la actividad de unión a FcγR y/o la función efectora en el contexto de la molécula de diacuerpo u otra molécula que contenga Fc (por ejemplo, una inmunoglobulina) que comprende una región Fc de tipo silvestre como se describe en el presente documento o como se conoce en la técnica; la combinación de dicha modificación de aminoácidos y región de la IgG seleccionadas "opuestas" actúan entonces para atemperar o reducir selectivamente una funcionalidad específica en el diacuerpo de la divulgación con respecto a un diacuerpo de la divulgación que no comprende una región Fc o que comprende una región Fc de tipo silvestre del mismo isotipo. Como alternativa, se describen regiones Fc variantes que comprenden combinaciones de modificaciones de aminoácidos conocidas en la técnica y regiones de IgG seleccionadas que muestran propiedades novedosas, en donde dichas propiedades no fueron detectables cuando dichas modificaciones y/o regiones se ensayaron de manera independiente como se describe en el presente documento.

Las características funcionales de los múltiples isotipos de IgG y los dominios de los mismos, son bien conocidas en la técnica. Las secuencias de aminoácidos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se presentan en las FIG. 1A-1B. La selección y/o combinaciones de dos o más dominios de isotipos de IgG específicos para su uso en los métodos pueden basarse en cualquier parámetro conocido de los isotipos precursores, incluyendo la afinidad por FcγR (tabla 7; Flesch et al. (2000) "Functions Of The Fc Receptors For Immunoglobulin G", J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel et al. (1993) "Identification Of A Secondary Fc Gamma RI Binding Site Within A Genetically Engineered Human IgG Antibody", J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel et al. (1991) "Identification Of The Fc Gamma Receptor Class I Binding Site In Human IgG Through The Use Of Recombinant IgG1/IgG2 Hybrid And Point-Mutated Antibodies", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9036-9040). Por ejemplo, el uso de regiones o dominios derivados de los isotipos de IgG que presentan unión limitada o no se unen a FcγRIIB, por ejemplo, IgG2 o IgG4, pueden encontrar un uso particular cuando se desea modificar por ingeniería un diacuerpo para aumentar al máximo la unión a un receptor activador y reducir al mínimo la unión a un receptor inhibidor. De forma análoga, el uso de regiones o dominios Fc de isotipos de IgG conocidos por unirse preferentemente a C1q o FcγRIIIA, por ejemplo, IgG3 (Brüggemann et al. (1987) "Comparison Of The Effector Functions Of Human Immunoglobulins Using A Matched Set Of Chimeric Antibodies", J. Exp. Med. 166:1351-1361), pueden combinarse con las modificaciones de aminoácidos de Fc conocidas en la técnica para mejorar la ADCC, para diseñar una molécula de diacuerpo tal que la actividad de función efectora, por ejemplo, activación del complemento o ADCC, se maximiza.

Tabla 7. Características generales de la unión de IgG a FcγR, adaptadas de Flesch y Neppert, 1999, J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156

Receptor	Afinidad estimada para IgG (M^{-1})	Afinidad relativa
FcγRI	10^8 - 10^9	IgG3>IgG1>>IgG4 sin unión: IgG2
FcγRIIA $R^{131\ A}$	$<10^7$	IgG3>IgG1 sin unión: IgG2, IgG4
FcγRIIA $H^{131\ A}$	$<10^7$	IgG3>IgG1>IgG2 sin unión: IgG4
FcγRIIB [A]	$<10^7$	IgG3>IgG1>IgG4 sin unión: IgG2
FcγRIII	$<10^7$	IgG3=IgG1 sin unión: IgG2,IgG4
[A] solo se une a IgG complejada		

5.3 CONJUGADOS MOLECULARES

Las moléculas de diacuerpo descritas en el presente documento pueden fusionarse de manera recombinante o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) a polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido no relacionado o una porción del mismo, preferentemente, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido para generar proteínas de fusión. La fusión no es necesariamente directa, sino que puede producirse a través de secuencias enlazadoras.

Además, las moléculas de diacuerpo de la divulgación (es decir, polipéptidos) pueden conjugarse a un agente terapéutico o a un resto de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Como alternativa a la conjugación directa, debido a los múltiples sitios de unión en las moléculas de diacuerpo multivalentes, por ejemplo, tetravalentes, de la divulgación, al menos una región de unión del diacuerpo puede diseñarse para que se una al agente terapéutico o al resto de fármaco deseado sin afectar a la unión del diacuerpo.

Los agentes terapéuticos o restos de fármacos no se consideran limitados a los agentes terapéuticos químicos convencionales. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas (es decir, PE-40) o toxina diftérica, ricina, gelonina y proteína antivírica de la hierba carmín, una proteína, tal como el factor de necrosis tumoral, interferones, incluyendo, pero sin limitación, interferón α (IFN-α), interferón β (IFN-β), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador de plasminógeno tisular (TPA), un agente apoptótico (por ejemplo, TNF-α, TNF-β, AIM I como se divulga en la Publicación PCT n.º WO 97/33899), AIM II (véase la Publicación PCT n.º WO 97/34911), ligando de Fas y VEGI (Publicación PCT n.º WO 99/23105), un agente trombogénico o un agente antiangiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina) o un modificador de la respuesta biológica, tal como, por ejemplo, una linfocina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor de estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF") y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), factor estimulante de colonias de macrófagos ("M-CSF") o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento ("GH"); proteasas o ribonucleasas.

Las moléculas de diacuerpo de la divulgación (es decir,, polipéptidos) se pueden fusionar con secuencias marcadoras, como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos del marcador es un péptido de hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales se encuentran disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz et al. (1989) "Bioassay For Trans-Activation Using Purified Human Immunodeficiency Virus TAT-Encoded Protein: Trans-Activation Requires mRNA Synthesis", Proc. Natl Acad Sci. USA, 86: 821-824, por ejemplo, la hexa-histidina posibilita una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros marcadores peptídicos útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, el marcador "HA" de hemaglutinina, que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson et al. (1984) "The Structure Of An Antigenic Determinant In A Protein", Cell, 37: 767-778) y el marcador "flag" (Knappik et al. (1994) "An Improved Affinity Tag Based On The FLAG Peptide For The Detection And Purification Of Recombinant Antibody Fragments", Biotechniques, 17 (4):754-761).

Otras proteínas de fusión adicionales se pueden generar mediante las técnicas de intercambio de genes, reordenamiento de motivos, reordenamiento de exones y/o reordenamiento de codones (citadas colectivamente como "reordenamiento de ADN"). El intercambio de ADN puede emplearse para modificar las actividades de las moléculas de la divulgación (por ejemplo, los sitios de unión a epítopo con mayores afinidades y menores constantes de disociación). Véase, en general, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458 y Patten et al. (1997) "Applications Of DNA Shuffling To Pharmaceuticals And Vaccines", Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-733; Harayama (1998) "Artificial Evolution By DNA Shuffling", Trends Biotechnol. 16:76-82; Hansson et al. (1999) "Evolution Of Differential Substrate Specificities In Mu Class Glutathione Transferases Probed By DNA Shuffling", J. Mol. Biol. 287:265-276; y Lorenzo et al. (1998) "PCR-Based Method For The Introduction Of Mutations In Genes Cloned And Expressed In Vaccinia Virus", BioTechniques 24:308-313. Las moléculas de diacuerpo de la divulgación o los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la divulgación, además se pueden modificar para someterse a una mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, inserción de nucleótidos aleatorios u otros métodos previos a la recombinación. Una o más partes de un polinucleótido que codifique una molécula de la divulgación, pueden ser recombinadas con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

La presente divulgación también engloba moléculas de diacuerpo de la divulgación conjugadas a o que reconocen de manera inmunoespecífica un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para la que se desea una semivida en suero mayor/menor y/o dirigida a un determinado subconjunto de células. Las moléculas de la divulgación pueden usarse a efectos diagnósticos para, por ejemplo, controlar el desarrollo o la progresión de una enfermedad, un trastorno o una infección como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento concreto. La detección se puede facilitar acoplando las moléculas de la divulgación a una sustancia detectable o mediante las moléculas que reconocen de manera

inmunoespecífica la sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente a las moléculas de la divulgación o indirectamente a través de un producto intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas, o la molécula puede reconocer de manera inmunoespecífica la sustancia detectable: la unión inmunoespecífica a dicha sustancia. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como agente de diagnóstico. Dichos diagnóstico y detección pueden realizarse diseñando las moléculas para que reconozcan de manera inmunoespecífica la sustancia detectable o mediante el acoplamiento de las moléculas de la divulgación a sustancias detectables incluyendo, pero sin limitación, diversas enzimas, enzimas que incluyen, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, pero sin limitación, umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente tal como, pero sin limitación, luminol; materiales bioluminiscentes tales como, pero sin limitación, luciferasa, luciferina y aecuorina; material radiactivo tal como, pero sin limitación, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{14}C), cromo (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co), flúor (^{18}F), gadolinio (^{153}Gd, ^{159}Gd), galio (^{68}Ga, ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indio (^{115}In, ^{113}In, ^{112}In, ^{111}In), yodo (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), lantano (^{140}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re, ^{188}Re), rodio (^{105}Rh), rutenio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}SC), selenio (^{75}Se), estroncio (^{85}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), estaño (^{113}Sn, ^{117}Sn), tritio (^{3}H), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb, ^{175}Yb), itrio (^{90}Y), cinc (^{65}Zn); metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Las moléculas de diacuerpo de la divulgación pueden reconocer de manera inmunoespecífica o conjugarse a un resto terapéutico tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radiactivo (por ejemplo, emisores alfa, emisores gamma, *etc.).* Los agentes citotóxicos o citotoxinas incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y *cis*-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorrubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Además, una molécula de diacuerpo de la divulgación puede conjugarse o puede diseñarse para reconocer de manera inmunoespecífica restos terapéuticos tales como materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos (véase lo anterior para los ejemplos de los materiales radiactivos). En determinadas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N",N"'-tetraacético (DOTA) que puede unirse al polipéptido mediante una molécula enlazadora. Dichas moléculas enlazadoras se conocen comúnmente en la técnica y se describen en Denardo et al. (1998) "Comparison Of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N",N"'-Tetraacetic Acid (DOTA)-Peptide-ChL6, A Novel Immunoconjugate With Catabolizable Linker, To 2-Iminothiolane-2-[p-(bromoacetamido)benzyl]-DOTA-ChL6 In Breast Cancer Xenografts", Clin. Cancer Res. 4:2483-2490; Peterson et al. (1999) "Enzymatic Cleavage Of Peptide-Linked Radiolabels From Immunoconjugates, Bioconjug. Chem. 10:553-; y Zimmerman et al, (1999) "A Triglycine Linker Improves Tumor Uptake And Biodistributions Of 67-Cu-Labeled Anti-Neuroblastoma mAb chCE7 F(ab)2 Fragments", Nucl. Med. Biol. 26:943-950.

Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos a los polipéptidos, incluyendo, por ejemplo, dominios Fc, son bien conocidas; véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), 1985, pág. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2.ª Ed.), Robinson et al. (eds.), 1987, pág. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), 1985, págs. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), 1985, pág. 303-16, Academic Press; y Thorpe et al. (1982) "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-158.

Las moléculas de diacuerpo de la divulgación pueden administrarse con o sin un resto terapéutico conjugado a las mismas, pueden administrarse solas o combinadas con factor/es citotóxico/s y/o citocina/s para su uso como tratamiento terapéutico. Cuando se administran solas, puede diseñarse al menos un epítopo de una molécula de

diacuerpo multivalente, por ejemplo, tetravalente, para que reconozca inmunoespecíficamente a una diana terapéutica, por ejemplo, factor/es citotóxico/s y/o citocina/s, que puede administrarse de manera concurrente o posterior a la molécula de la divulgación. De esta manera, la molécula de diacuerpo puede escoger específicamente el agente terapéutico de manera similar a la conjugación directa. Como alternativa, una molécula de la divulgación puede conjugarse a un anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos según lo descrito por Segal en la patente de los Estados Unidos n.º 4.676.980. Las moléculas de diacuerpo de la divulgación también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o la purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE DIACUERPO

Las moléculas de diacuerpo de la presente divulgación pueden caracterizarse de una variedad de formas. En particular, las moléculas de la divulgación pueden ensayarse para determinar la capacidad para unirse de manera inmunoespecífica a un antígeno, por ejemplo, FcRIIIA o FcRIIB, o, cuando la molécula comprende un dominio Fc (o una parte del mismo) para determinar la capacidad para presentar interacciones Fc-FcγR, es decir, la unión específica de un dominio Fc (o parte del mismo) a un FcγR. Dicho ensayo se puede realizar en solución (por ejemplo, Houghten (1992) "The Use Of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries For The Identification Of Bioactive Peptides", BioTechniques, 13:412-421), sobre perlas (Lam (1991) "A New Type Of Synthetic Peptide Library For Identifying Ligand-Binding Activity", Nature, 354:82-84, sobre microplacas (Fodor (1993) "Multiplexed Biochemical Assays With Biological Chips", Nature, 364:555-556), sobre bacterias (patente de los Estados Unidos n.º 5.223.409), sobre esporas (patentes de los Estados Unidos n.º 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), sobre plásmidos (Cull et al. (1992) "Screening For Receptor Ligands Using Large Libraries Of Peptides Linked To The C Terminus Of The Lac Repressor", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1865-1869) o sobre un fago (Scott et al. (1990) "Searching For Peptide Ligands With An Epitope Library", Science, 249:386-390; Devlin (1990) "Random Peptide Libraries: A Source Of Specific Protein Binding Molecules", Science, 249:404-406; Cwirla et al. (1990) "Peptides On Phage: A Vast Library Of Peptides For Identifying Ligands", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382; y Felici (1991) "Selection Of Antibody Ligands From A Large Library Of Oligopeptides Expressed On A Multivalent Exposition Vector", J. Mol. Biol., 222:301-310). Las moléculas que se hayan identificado para unirse de manera inmunoespecífica a un antígeno, por ejemplo, FcγRIIIA, se pueden ensayar luego para determinar su especificidad y afinidad por el antígeno.

Las moléculas de la divulgación que se han modificado para que comprendan múltiples dominios de unión a epítopo pueden ensayarse respecto de su unión inmunoespecífica a uno o más antígenos (por ejemplo, antígenos de cáncer y reactividad cruzada con otros antígenos (por ejemplo, FcγR)) o, cuando las moléculas comprenden un dominio Fc (o una parte del mismo), para interacciones Fc-FcγR mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión inmunoespecífica, reactividad cruzada e interacciones Fc-FcγR incluyen, pero sin limitación, pero sin limitación, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos usando técnicas tales como el análisis de transferencia Western, ensayos radioinmunológicos, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a una enzima), inmunoensayos en "sándwich", ensayos de precipitación inmunológica, reacciones de precipitación, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos de radiometría inmunológica, ensayos inmunológicos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, por nombrar solo algunos. Dichos ensayos son habituales y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, "Current Protocols in Molecular Biology", Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

La afinidad de unión y la constante de desactivación de la interacción del dominio de unión al antígeno o la interacción Fc-FcγR pueden determinarse con ensayos de unión competitivos. Un ejemplo de un ensayo de unión competitivo es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno marcado, tales como FcγR tetramérico (por ejemplo, ^{3}H o ^{125}I, véase el apartado 5.4.1) con una molécula de interés (por ejemplo, las moléculas de la presente divulgación que comprenden múltiples dominios de unión a epítopo en presencia de cantidades crecientes del epítopo no marcado, tal como FcγR tetramérico (véase el apartado 5.4.1), y la detección de la molécula unida al antígeno marcado. La afinidad de la molécula de la presente divulgación para un antígeno y las constantes de desactivación de la unión pueden determinarse a partir de los datos de saturación mediante el análisis de Scatchard.

Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas de la divulgación para un antígeno o FcγR pueden determinarse inicialmente usando ensayos *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para interacciones antígeno-dominio de unión o Fc-FcγR, interacciones, incluyendo, pero sin limitación, ensayo de ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación. Preferentemente, las propiedades de unión de las moléculas de la divulgación también se caracterizan mediante ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de células efectoras mediadoras de FcγR, como se describe en el apartado 5.4.2. En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la divulgación tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tales como los descritos y desvelados en el presente documento) como aquellos ensayos basados *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye moléculas de la divulgación que no presenten el fenotipo deseado en los ensayos *in vitro*, pero que presenten el fenotipo deseado *in vivo*.

En algunas realizaciones, el rastreo y la identificación de moléculas que comprenden múltiples dominios de unión al epítopo y, opcionalmente, dominios Fc (o partes de los mismos) se realizan ensayos de base funcional, preferentemente de alto rendimiento. Los ensayos de base funcional pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones de células efectoras mediada por FcγR, tales como aquellas que se describen en el presente documento en los apartados 5.4.2 y 5.4.3. Los ejemplos no limitantes de las funciones de células efectoras que pueden usarse de acuerdo con los métodos descritos, incluyen, pero sin limitación, citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a células, formación de rosetas, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependientes del complemento.

En una realización preferida, se usa el análisis cinético BIAcore para determinar las constantes de activación o desactivación de la unión de las moléculas de la presente divulgación a un antígeno y/o a FcγR. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y disociación de un antígeno o FcγR de microplacas con moléculas inmovilizadas (por ejemplo, moléculas que comprenden dominios de unión a epítopo o dominios Fc (o partes de los mismos), respectivamente) en su superficie. El análisis BIAcore se describe en el apartado 5.4.3.

Preferentemente, el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS), usando cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la materia, se usa para el ensayo inmunológico o funcional para caracterizar moléculas de la divulgación. Los citómetros de flujo son capaces de examinar rápidamente una gran cantidad de células individuales que se hayan unido, por ejemplo, opsonizadas, por moléculas de la divulgación (por ejemplo, 10-100 millones de células por hora) (Shapiro et al. (1995) Practical Flow Cytometry). Adicionalmente, los parámetros específicos que se usan para optimizar el comportamiento del diacuerpo incluyen, pero sin limitación, la concentración de antígeno (es decir, el complejo tetramérico FcγR, véase el apartado 5.4.1), el tiempo de la competencia cinética o condiciones rigurosas de FACS, pudiendo variarse todas ellas para seleccionar las moléculas de diacuerpo que comprendan las moléculas de la divulgación que presenten las propiedades de unión específicas, por ejemplo, unión concurrente a múltiples epítopos. Los citómetros de flujo para clasificar y examinar células biológicas son bien conocidos en la técnica. Los citómetros de flujo conocidos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. números 4.347.935; 5.464.581; 5.483.469; 5.602.039; 5.643.796; y 6.211.477. Otros citómetros de flujo conocidos son el sistema FACS Vantage™ fabricado por Becton Dickinson and Company, y el sistema COPAS™ fabricado por Union Biometrica.

La caracterización de la afinidad de unión al antígeno diana o la afinidad de unión a Fc-FcγR, y la valoración del antígeno diana o la densidad del FcγR en la superficie celular se pueden realizar mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como el análisis de Scatchard o mediante el uso de kits siguiendo las instrucciones del fabricante, tal como Quantum™ Simply Cellular ® (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). El uno o más ensayos funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones de las células efectoras mediadas por FcγR como es conocido por un experto en la materia o descrito en el presente documento. Las moléculas descritas en el presente documento comprenden múltiples dominios de unión a epítopo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo) se ensaya en un análisis de ELISA para determinar la unión a uno o más antígenos diana o uno o más FcγR, por ejemplo, FcγRIIIA, FcγRIIA, FcγRIIA; seguido por uno o más ensayos de ADCC. En algunas realizaciones, las moléculas de la divulgación se ensayan además usando un ensayo basado en la resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIAcore. Los ensayos basados en la resonancia de plasmón superficial son bien conocidos en la técnica y además se describen en el apartado 5.4.3, y se ilustran en el presente documento, por ejemplo, en el Ejemplo 6.1.

En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención comprenden múltiples dominios de unión a epítopo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo) se caracterizan además en un modelo animal para determinar la interacción con un antígeno diana (por ejemplo, un FcγR) o la interacción Fc-FcγR. Cuando se van a valorar interacciones de Fc-FcγR, los modelos animales preferidos para su uso en los métodos son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγR humanos, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.877.397 y 6.676.927. Otros ratones transgénicos para su uso en dichos métodos incluyen, pero sin limitación, ratones FcγRIIIA nuligénicos atímicos portadores de FcγRIIIA humano; ratones atímicos nuligénicos para FcγRIIIA portadores de FcγRIIA humano; ratones atímicos nuligénicos para FcγRIIIA portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIIA humano; ratones atímicos nuligénicos para FcγRIIIA portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIA humano; ratones atímicos nuligénicos para FcγRIIIA y FcγRIIA portadores de FcγRIIIA y FcγRIIA humano y atímicos nuligénicos para FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB portadores de FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB humano.

5.4.1 ENSAYOS DE UNIÓN QUE COMPRENDEN FcγR

La caracterización de la unión al FcγR con moléculas que comprenden un dominio Fc (o porción del mismo) y/o que comprenden el dominio de unión al epítopo específico para un FcγR se puede realizar usando cualquier FcγR, incluyendo, pero sin limitación, variantes polimórficas de FcγR. En algunas realizaciones, se usa una variante polimórfica de FcγRIIIA, que contiene una fenilalanina en la posición 158. En otras realizaciones, la caracterización se realiza usando una variante polimórfica de FcγRIIIA que contenga una valina en la posición 158. La variante polimórfica 158V de FcγRIIIA presenta mayor afinidad por IgG1 que la variante 158F y una actividad ADCC aumentada (véase, por ejemplo, Koene et al. (1997) "Fc gammaRIIIa-158V/F Polymorphism Influences The Binding

Of IgG By Natural Killer Cell Fc gammaRIIIa, Independently Of The Fc gammaRIIIa-48L/R/H Phenotype", Blood, 90:1109-14; Wu et al. (1997) "A Novel Polymorphism Of FcgammaRIIIa (CD16) Alters Receptor Function And Predisposes To Autoimmune Disease", J. Clin. Invest. 100: 1059-70; este resto, de hecho, interactúa directamente con la región bisagra inferior de IgG1 como se ha demostrado recientemente en estudios de cocristalización de IgG1-FcγRIIIA, véase, por ejemplo, Sondermann et al. (2000) "The 3.2-A Crystal Structure Of The Human IgG1 Fc Fragment-Fc gammaRIII complex", Nature, 406(6793):267-273. Los estudios han demostrado que en algunos casos, los anticuerpos terapéuticos tienen eficacia mejorada en pacientes homocigotos para FcγRIIIA-158V. Por ejemplo, el anticuerpo monoclinal anti-CD20 Rituximab fue terapéuticamente más eficaz en pacientes homocigotos para FcγRIIIA158V en comparación con pacientes heterocigotos para FcγRIIIA 158F (véase, por ejemplo, Cartron et al. (2002) "Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In IgG Fc Receptor FcgammaRIIIA Gene", Blood, 99(3): 754-758). En otras realizaciones, las moléculas terapéuticas que comprenden esta región también pueden ser más eficaces en pacientes heterocigotos para FcγRIIIA-158V y FcγRIIIA-158F y en pacientes con FcγRIIA-131H. Aunque no se pretende quedar limitado a ningún mecanismo de acción en particular, la selección de moléculas de la divulgación con alotipos alternativos puede posibilitar variantes que una vez modificadas en diacuerpos terapéuticos, serán clínicamente más eficaces para pacientes homocigotos para dicho alotipo.

Se desarrolló un ensayo de unión a FcγR para determinar la unión de las moléculas de la divulgación a FcγR, y, en particular, para determinar la unión de los dominios Fc a FcγR. Los ensayos permitieron realizar la detección y cuantificación de las interacciones Fc-FcγR, a pesar de la débil afinidad inherente del receptor por su ligando, por ejemplo, en el intervalo micromolar por FcγRIIB y FcγRIIIA. El método se describe con detalle en la solicitud internacional WO04/063351 y en las publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2005/0037000 y 2005/0064514. Resumiendo, el método implica la formación de un complejo de FcγR que se puede preparar en cualquier inmunoensayo convencional conocido en la técnica, por ejemplo, FACS, ELISA, resonancia del plasmón superficial, etc. Además, el complejo de FcγR tiene una mayor avidez por una región Fc, en comparación con un FcγR no complejado. De acuerdo con la divulgación, el complejo molecular preferido es un complejo tetramérico inmunitario, que comprende: (a) la región soluble de FcγR (por ejemplo, la región soluble de FcγRIIIA, FcγRIIA o FcγRIIB); (b) una secuencia AVITAG de 15 aminoácidos biotinilada (AVITAG) unida operativamente al extremo carboxi-terminal de la región soluble de FcγR (por ejemplo, la región soluble de FcγRIIIA, FcγRIIA o FcγRIIB); y (c) estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE); en una proporción molar para formar un complejo de FcγR tetramérico (preferentemente en una proporción molar de 5:1). La proteína de fusión se biotinila enzimáticamente, usando, por ejemplo, la enzima Bir A de *E. coli*, una biotina ligasa que biotinila específicamente un resto de lisina en la secuencia AVITAG de 15 aminoácidos. Las proteínas FcγR solubles biotiniladas se mezclan luego con SA-PE en una proporción molar de 1X SA-PE:5X FcγR soluble biotinilado para formar un complejo tetramérico de FcγR.

Los polipéptidos que comprenden las regiones Fc han demostrado unirse a los complejos tetraméricos de FcγR con al menos una afinidad 8 veces superior a la de FcγR monomérico no complejado. La unión de los polipéptidos que comprenden las regiones Fc a los complejos tetraméricos FcγR se puede determinar usando las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS), ensayos radioinmunológicos, ensayos ELISA, *etc.*

También se describe el uso de los complejos inmunes que comprenden moléculas de la divulgación y se forman de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, para determinar la funcionalidad de las moléculas que comprenden una región Fc en ensayos a base de células o libres de células.

Por cuestiones de conveniencia, los reactivos se pueden proporcionar en un kit para ensayo, es decir, una combinación envasada de reactivos para el ensayo de la capacidad de las moléculas que comprenden regiones Fc para unirse a los complejos tetraméricos de FcγR. Otras formas de complejos moleculares para su uso para determinar las interacciones de Fc-FcγR también se consideran útiles en los métodos, por ejemplo, proteínas de fusión.

5.4.2 ENSAYOS FUNCIONALES DE MOLÉCULAS CON CADENAS PESADAS VARIANTES

También se describe la caracterización de las moléculas descritas en el presente documento, que incluyen varios dominios de unión a epítopos y, opcionalmente, dominios Fc (o partes de los mismos) usando ensayos conocidos por los expertos en la materia para identificar la función de células efectoras de las moléculas. También se describe la caracterización de las moléculas de la divulgación respecto de la función de las células efectoras mediada por FcγR. Adicionalmente, cuando al menos uno de los antígenos diana de la molécula de diacuerpo de la divulgación es un FcγR, la unión del FcγR por la molécula de diacuerpo puede servir para activar las vías mediada por FcγR similares a las activadas por la unión de FcγR-Fc. Por lo tanto, cuando al menos un dominio de unión al epítopo de la molécula de diacuerpo reconoce un FcγR, la molécula de diacuerpo puede generar la función de célula efectora mediada por FcγR sin contener un dominio Fc (o parte del mismo), o sin la unión concomitante de Fc-FcγR. Los ejemplos de funciones de las células efectoras que pueden analizarse incluyen, pero sin limitación, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependientes del complemento. Se puede usar cualquier ensayo a base de células o libre de células conocido por los expertos en la materia para determinar la actividad de la función de células

efectoras (para ver los ensayos de células efectoras, véase Perussia et al. (2000) "Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC (Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells", Methods Mol. Biol. 121: 179-92; Baggiolini et al. (1988) "Cellular Models For The Detection And Evaluation Of Drugs That Modulate Human Phagocyte Activity", Experientia, 44(10): 841-848; Lehmann et al. (2000) "Phagocytosis: Measurement By Flow Cytometry", J. Immunol. Methods, 243(1-2): 229-42; Brown (1994) "In Vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction", Methods Cell Biol., 45: 147-64; Munn et al. (1990) "Phagocytosis Of Tumor Cells By Human Monocytes Cultured In Recombinant Macrophage Colony-Stimulating Factor", J. Exp. *Med.*, 172: 231-237, Abdul-Majid et al. (2002) "Fc Receptors Are Critical For Autoimmune Inflammatory Damage To The Central Nervous System In Experimental Autoimmune Encephalomyelitis", Scand. J. Immunol. 55: 70-81; Ding et al. (1998) "Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids", Immunity 8:403-411).

En una realización, las moléculas de la divulgación pueden ensayarse para determinar la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos humanos. Como alternativa, la fagocitosis mediada por FcγR de las moléculas de la divulgación puede ensayarse en otros fagocitos, por ejemplo, neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN); monocitos de sangre periférica humana, macrófagos derivados de monocitos, que puede obtenerse utilizando procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, véase Brown (1994) "*In Vitro* Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction", Methods Cell Biol., 45: 147-164). En una realización, la función de las moléculas de la divulgación se caracteriza midiendo la capacidad de las células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de oveja (SRBC) opsonizados con IgG fluoresceinada mediante los métodos descritos previamente (Tridandapani et al. (2000) "The Adapter Protein LAT Enhances Fcgamma Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells", J. Biol. Chem. 275: 20480-20487).

Otro ensayo ilustrativo para determinar la fagocitosis de las moléculas de la divulgación es un ensayo de opsonofagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP) que puede comprender lo siguiente: recubrir una biopartícula diana, tal como *Escherichia coli* marcadas con FITC (Molecular Probes) o *Staphylococcus aureus* marcadas con FITC con (i) anticuerpo 4-4-20 de tipo silvestre, un anticuerpo anti-fluoresceína (véase Bedzyk et al. (1989) "Comparison Of Variable Region Primary Structures Within An Anti-Fluorescein Idiotype Family", J. Biol. *Chem*, 264(3): 1565-1569), como el anticuerpo de control para el ensayo ADCP dependiente de FcγR; o (ii) el anticuerpo 4-4-20 que alberga la mutación D265A que anula la unión a FcγRIII, como control de fondo para el ensayo ADCP dependiente de FcγR (iii) un diacuerpo que comprende el dominio de unión al epítopo del anticuerpo 4-4-20 y un dominio Fc y/o un dominio de unión al epítopo específico para FcγRIII; y la formación de la partícula opsonizada; la adición de cualquiera de las partículas opsonizadas descritas (i-iii) a las células efectoras THP-1 (una estirpe celular monocítica disponible de ATCC) en una proporción de 1:1, 10:1, 30:1, 60:1, 75:1 o 100:1 para permitir que se produzca la fagocitosis mediada por FcγR; preferentemente incubando las células y *E. coli*-FITC/anticuerpo a 37 °C durante 1,5 horas; la adición de azul de tripano tras la incubación (preferentemente a temperatura ambiente durante 2-3 min) a las células para inactivar la fluorescencia de las bacterias que se adhieren al exterior de la superficie celular sin ser internalizadas; la transferencia de células a un tampón para FACS (por ejemplo, 0,1 %, BSA en PBS, azida de sodio al 0,1%), analizando la fluorescencia de linfocitos THP1 usando FACS (por ejemplo, BD FACS Calibur). Preferentemente, las células THP-1 que se usan en el ensayo se analizan por FACS para determinar la expresión de FcγR en la superficie celular. Las células THP-1 expresan CD32A y CD64. CD64 es un FcγR de alta afinidad que se bloquea para realizar el ensayo ADCP de acuerdo con los métodos de la invención. Las células THP-1 preferentemente se bloquean con IgG1 soluble a 100 µg/ml o suero humano al 10 %. Para analizar la magnitud de la ADCP, se establece preferentemente la ventana de análisis en las células THP-1 y se mide la mediana de la intensidad de la fluorescencia. La actividad ADCP para mutantes individuales se calcula y se presenta como el valor normalizado para el chMab 4-4-20 de tipo silvestre obtenido. Las partículas opsonizadas se añaden a células THP-1 de manera que la proporción de las partículas opsonizadas con respecto a las células THP-1 es de 30:1 o 60:1. En las realizaciones más preferidas, el ensayo ADCP se realiza con controles, tales como *E. coli*-FITC en medio, *E. coli*-FITC y células THP-1 (para que sirvan como actividad ADCP independiente de FcγR), *E. coli*-FITC, células THP-1 y anticuerpo 4-4-20 de tipo silvestre (para que sirva como actividad ADCP dependiente de FcγR), *E coli-FITC,* células THP-1, D265A de 4-4-20 (para que sirva como control de fondo para la actividad ADCP dependiente de FcγR).

En otra realización, las moléculas de la divulgación pueden ensayarse para determinar la actividad ADCC mediada por FcγR en células efectoras, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales, usando cualquiera de los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Perussia et al. (2000) "Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC (Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells", Methods Mol. Biol. 121: 179-92; Weng et al. (2003) "Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma", J. Clin. Oncol. 21:3940-3947; Ding et al. (1998) "Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids", Immunity 8:403-411). Un ensayo ilustrativo para determinar la actividad ADCC de las moléculas de la divulgación se basa en un ensayo de liberación de ^{51}Cr que comprende: marcar células diana con $[^{51}Cr]Na_2CrO_4$ (esta molécula permeable en la membrana celular se usa comúnmente para marcaje puesto que se une a las proteínas citoplasmáticas y, aunque es liberada espontáneamente de células con cinética lenta, se libera masivamente después de la necrosis de células diana);

opsonización de células diana con las moléculas de la divulgación que comprenden cadenas pesadas variantes; la combinación de células diana radiomarcadas, opsonizadas con células efectoras en una placa de microtitulación en una proporción apropiada de células diana con respecto a células efectoras; la incubación de la mezcla de células durante 16-18 horas a 37 ºC; la recogida de los sobrenadantes; y el análisis de la radiactividad. La citotoxicidad de las moléculas de la divulgación entonces se puede determinar, por ejemplo, usando la siguiente fórmula: % de lisis = (cpm experimental – cpm de fuga diana)/(cpm de lisis con detergente – cpm de fuga diana) x 100 %. Como alternativa, el % de lisis = (ADCC-AICC)/(liberación máxima - liberación espontánea). La lisis específica se puede calcular usando la fórmula: lisis específica = % de lisis con las moléculas de la divulgación - % de lisis en ausencia de las moléculas de la divulgación. Puede generarse una gráfica variando la relación de diana:células efectoras o la concentración de anticuerpo.

Preferentemente, las células efectoras que se usan en los ensayos ADCC son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que preferentemente se purifican de sangre humana normal, usando los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, usando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll Paque. Las células efectoras preferidas para su uso en los métodos de la invención expresan diferentes receptores activadores de FcγR. También se describen células efectoras, THP-1, que expresan FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIB, y macrófagos primarios derivados de monocitos derivados de sangre humana completa que expresan FcγRIIIA y FcγRIIB, para determinar si los mutantes de cadena pesada de los anticuerpos muestran actividad ADCC aumentada y fagocitosis respecto a los anticuerpos IgG1 de tipo silvestre.

La estirpe celular de monocitos humanos, THP-1, activa la fagocitosis mediante la expresión del receptor de alta afinidad FcγRI y el receptor de baja afinidad FcγRIIA usando un método conocido por los expertos en la materia (Fleit et al. (1991) "The Human Monocyte-Like Cell Line THP-1 Expresses Fc Gamma RI And Fc Gamma RII", J. Leuk. Biol. 49: 556-565). Las células THP-1 no expresan de manera constitutiva FcγRIIA o FcγRIIB. La estimulación de estas células con citocinas afecta al patrón de expresión de FcR (Pricop et al. (2001) "Differential Modulation Of Stimulatory And Inhibitory Fc Gamma Receptors On Human Monocytes By Th1 And Th2 Cytokines", J. of Immunol., 166: 531-537). El crecimiento de células THP-1 en presencia de citocina IL4 induce la expresión de FcγRIIB y ocasiona una disminución en la expresión de FcγRIIA y FcγRI. La expresión de FcγRIIB también puede potenciarse aumentando la densidad celular (Tridandapani et al. (2002) "Regulated Expression And Inhibitory Function Of Fcgamma RIIB In Human Monocytic Cells", J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089). Por el contrario, Por el contrario, se ha notificado que IFNγ puede conducir a la expresión de FcγRIIIA (Pearse et al. (1993) "Interferon Gamma-Induced Transcription Of The High-Affinity Fc Receptor For IgG Requires Assembly Of A Complex That Includes The 91-kDa Subunit Of Transcription Factor ISGF3", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 4314-4318). La presencia o ausencia de receptores en la superficie celular se puede determinar usando FACS con los métodos comunes conocidos por los expertos en la materia. La expresión de FcγR inducida por citocinas en la superficie celular proporciona un sistema para ensayar la activación e inhibición en presencia de FcγRIIB. Si las células THP-1 no pueden expresar el FcγRIIB otra línea celular de monocitos humanos, U937, se pueden usar. Se ha demostrado que estas células se diferencian de manera terminal en macrófagos en presencia de IFNγ y TNF (Koren et al. (1979) "*In Vitro* Activation Of A Human Macrophage-Like Cell Line", Nature 279: 328-331).

La destrucción de células tumorales dependiente de FcγR está mediada por linfocitos NK y macrófagos en modelos tumorales en ratones (Clynes et al. (1998) "Fc Receptors Are Required In Passive And Active Immunity To Melanoma", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 652-656). También se describe el uso de monocitos elutriados de donantes como células efectoras para analizar la eficacia de los mutantes de Fc para generar la citotoxicidad celular de células diana en ensayos de fagocitosis y ADCC. Los patrones de expresión de FcγRI, FcγRIIIA y FcγRIIB se ven afectados por diferentes condiciones de crecimiento. La expresión de FcγR de monocitos elutriados congelados, monocitos elutriados frescos, monocitos mantenidos en FBS al 10 %, y monocitos cultivados en FBS + GM-CSF y/o en suero humano se pueden determinar usando los métodos comunes para los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden teñir las células con anticuerpos específicos de FcγR y analizarlas por FACS para determinar los perfiles de FcR. Las condiciones que mejor imitan la expresión de FcγR *in vivo* de los macrófagos se usan después para los métodos del presente documento.

También se describe el uso de células de ratón, especialmente cuando las células humanas con los perfiles FcγR correctos no pueden obtenerse. También se describe la estirpe de células de macrófagos de ratón RAW264.7(ATCC) que puede transfectarse con FcγRIIIA humano y los transfectantes estables se aíslan usando los métodos conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Ralph et al. (1977) "Antibody-Dependent Killing Of Erythrocyte And Tumor Targets By Macrophage-Related Cell Lines: Enhancement By PPD And LPS", J. Immunol. 119: 950-4). Los transfectantes pueden cuantificarse para determinar la expresión de FcγRIIIA mediante análisis de FACS usando la experimentación rutinaria, y los de alta expresión pueden usarse en ensayos ADCC. También se describe el aislamiento de macrófagos peritoneales del bazo que expresan FcγR humano de ratones transgénicos nuligénicos tales como los descritos en el presente documento.

Pueden recogerse linfocitos de sangre periférica de donantes (PBM) usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Dentro de la población de células mononucleares aisladas, la mayor parte de la actividad ADCC se encuentra a través de los linfocitos citolíticos naturales (NK) que contengan FcγRIIIA, pero no FcγRIIB en su

superficie. Los resultados con estas células indican la eficacia de los mutantes en la activación de ADCC de los linfocitos NK y establecen los reactivos para realizar ensayos con monocitos elutriados.

Las células diana utilizadas en los ensayos ADCC incluyen, pero sin limitación, estirpes celulares de cáncer de mama, por ejemplo, SK-BR-3 con número de registro ATCC HTB-30 (véase, por ejemplo, Tremp et al. (1976) "Human Breast Cancer In Culture", Recent Results Cancer Res. 33-41); Linfocitos B; células derivadas de linfoma de Burkitt, por ejemplo, células Raji con número de registro ATCC CCL-86 (véase, por ejemplo, Epstein et al. (1965) "Characteristics And Mode Of Growth Of Tissue Culture Strain (EB1) Of Human Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma", J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-240), y células Daudi con el número de Registro de la ATCC CCL-213 (véase, por ejemplo, Klein et al. (1968) "Surface IgM-Kappa Specificity On A Burkitt Lymphoma Cell *In Vivo* And In Derived Culture Lines", Cancer Res. 28: 1300-1310). Las células diana pueden ser reconocidas por el sitio de unión al antígeno de la molécula de diacuerpo que se va a ensayar.

El ensayo ADCC se basa en la capacidad de los linfocitos NK para mediar en la muerte celular a través de una vía apoptótica. Los linfocitos NK median en la muerte celular en parte por el reconocimiento de FcγRIIIA de un dominio Fc de IgG unido a un antígeno en una superficie celular. Los ensayos ADCC que se usan de acuerdo con los métodos del presente documento pueden ser ensayos basados en la radiactividad o ensayos basados en la fluorescencia. El ensayo de ADCC usado para caracterizar las moléculas descritas en el presente documento que comprenden regiones Fc variantes comprende marcar las células diana, por ejemplo, SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, Daudi, la opsonización de células diana con un anticuerpo que reconozca un receptor de superficie celular en la célula diana a través de su sitio de unión al antígeno; la combinación de células diana opsonizadas, marcadas y las células efectoras en una proporción apropiada, que puede determinarse mediante experimentación rutinaria; cosechar las células; detectar el marcador en el sobrenadante de células diana lisadas, usando un esquema de detección apropiado basado en el marcador usado. Las células diana se pueden marcar con un marcador radiactivo o un marcador fluorescente, usando los métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, los marcadores incluyen, pero sin limitación, [^{51}Cr]Na_2CrO_4; y el éster acetoximetílico del ligando de potenciación de la fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato (TDA).

En una realización específica preferida, se usa un ensayo fluorimétrico con resolución temporal para medir la actividad ADCC contra células diana que se han marcado con el éster acetoximetílico del ligando de potenciación de la fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato (TDA). Dichos ensayos fluorimétricos son conocidos en la técnica, por ejemplo, véase, Blomberg et al. (1996) "Time-Resolved Fluorometric Assay For Natural Killer Activity Using Target Cells Labelled With A Fluorescence Enhancing Ligand", Journal of Immunological Methods, 193: 199-206. Resumiendo, se marcan las células diana con el diéster acetoximetílico de TDA (2,2':6'2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato de bis(acetoximetilo)), (BATDA), que rápidamente se difunde a través de la membrana celular de células viables. Las esterasas intracelulares escinden los grupos éster, y la molécula TDA impermeable en la membrana regenerada se queda atrapada dentro de la célula. Tras la incubación de células efectoras y diana, por ejemplo, durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37 °C, bajo CO_2 al 5 %, la molécula de TDA liberada de células diana lisadas se quela con Eu^{3+} y se cuantifica la fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados en un fluorómetro de resolución temporal (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallace).

En otra realización específica, el ensayo de ADCC que se usa para caracterizar las moléculas descritas en el presente documento que comprenden múltiples sitios de unión a epítopo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo) comprende las siguientes etapas: preferentemente 4-5x10^6 células diana (por ejemplo, células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji) se marcan con bis(acetoximetil)2,2,:6',2"-terpiridin-t-6"-dicarboxilato (reactivo DELFIA BATDA, Perkin Elmer/Wallac). Para una eficacia óptima del marcaje, el número de células diana que se usa en el ensayo ADCC preferentemente no debe ser superior a 5x10^6. Se añade el reactivo BATDA a las células y la mezcla se incuba a 37 °C, preferentemente con el CO_2 al 5 %, durante al menos 30 minutos. Después, se lavan las células con un tampón fisiológico, por ejemplo, PBS con sulfinpirazol 0,125 mM, y medios que contienen sulfinpirazol 0,125 mM. Las células diana marcadas luego se opsonizan (se recubren) con una molécula descrita en el presente documento que contenga un dominio de unión al epítopo específico para FcγRIIA y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo). En las realizaciones preferidas, la molécula usada en el ensayo ADCC también es específica de un receptor de superficie celular, un antígeno tumoral o un antígeno del cáncer. La molécula de diacuerpo de la invención puede unirse específicamente a cualquier antígeno del cáncer o tumoral, tal como los que se enumeran en el apartado 5.6.1. Las células diana del ensayo ADCC se seleccionan de acuerdo con los sitios de unión a epítopo modificados por ingeniería en el diacuerpo de la divulgación, de modo que el diacuerpo se una específicamente a un receptor de superficie celular de la célula diana.

Las células diana se añaden a las células efectoras, por ejemplo, PBMC, para obtener proporciones de células efectoras: células diana de aproximadamente 1:1, 10:1, 30:1, 50:1, 75:1 o 100:1. Las células efectoras y diana se incuban durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37 °C, bajo CO_2 al 5 %. Se recogen los sobrenadantes celulares y se añaden a una solución ácida de europio (por ejemplo, solución DELFIA Europium, Perkin Elmer/Wallac). La fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados se cuantifica en un fluorómetro de resolución temporal (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac). La liberación máxima (LM) y la liberación espontánea (LE) se determinan mediante la incubación de células diana con TX-100 al 1 % y medio solo, respectivamente. La citotoxicidad celular independiente de los anticuerpos (AICC) se mide mediante la incubación de

células diana y efectoras en ausencia de una molécula de ensayo, por ejemplo, diacuerpo de la divulgación. Cada ensayo se realiza preferentemente por triplicado. La media del porcentaje de la lisis específica se calcula como: liberación experimental (ADCC) - AICC)/(LM-LE) x 100.

También se describen ensayos conocidos en la técnica, y se ejemplifican en el presente documento, para caracterizar la unión de C1q y la mediación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) por las moléculas descritas en el presente documento que comprenden los dominios Fc (o partes de los mismos). Para determinar la unión a C1q, puede realizarse un ensayo ELISA de unión a C1q. Un ensayo ilustrativo puede comprender lo siguiente: se pueden recubrir placas de ensayo durante la noche a 4 °C con polipéptido que comprenda una molécula de la divulgación o polipéptido de partida (control) en un tampón de recubrimiento. Después, las placas se lavan y se bloquean. Tras lavar, se puede añadir a cada pocillo una alícuota de C1q humano e incubarse durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras un lavado adicional, se pueden añadir a cada pocillo 100 ul de un anticuerpo de oveja anti-C1q de complemento conjugado a peroxidasa e incubarse durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se puede lavar otra vez con tampón de lavado y se pueden añadir a cada pocillo 100 µl de tampón de sustrato que contenga OPD (diclorhidrato de O-fenilendiamina (Sigma)). La reacción de oxidación, observada por la aparición de un color amarillo, puede dejarse actuar durante 30 minutos y detenerse mediante la adición de 100 ul de 4,5 NH2 SO4. Luego se lee la absorbancia a (492-405) nm.

Para evaluar la activación de complemento, se puede realizar un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, según lo descrito en Gazzano-Santoro et al. (1997) "A Non-Radioactive Complement-Dependent Cytotoxicity Assay For Anti-CD20 Monoclonal Antibody", J. Immunol. Methods 202:163-171. Resumiendo, se pueden diluir con tampón diversas concentraciones de la molécula que comprende un dominio Fc (variante) (o parte del mismo) y complemento humano. Las células que expresan el antígeno al que se une la molécula de diacuerpo pueden diluirse hasta una densidad de aproximadamente $1x10^6$ células/ml. Se pueden añadir mezclas de las moléculas de diacuerpo que comprenden un dominio Fc (variante) (o parte del mismo), complemento humano diluido y células que expresan el antígeno a una placa de 96 pocillos para cultivo tisular, de fondo plano y dejarse incubar durante 2 horas a 37 °C y CO_2 al 5 % para facilitar la lisis celular mediada por el complemento. Se pueden añadir entonces 50 ul de azul de alamar (Accumed International) a cada pocillo e incubarse durante la noche a 37 °C. Se mide la absorbancia usando un fluorómetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados pueden expresarse en unidades de fluorescencia relativa (UFR). Las concentraciones de la muestra se pueden calcular a partir de una curva patrón y el porcentaje de actividad en comparación con la molécula no variante, es decir, una molécula que no comprende un dominio Fc o que comprende un dominio Fc no variante, se reporta para la variante de interés.

5.4.3 OTROS ENSAYOS

Las moléculas de la divulgación que comprenden múltiples dominios de unión a epítopo y, opcionalmente, un dominio Fc se pueden ensayar usando cualquiera de los ensayos basados en la resonancia de plasmón superficial conocidos en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de un dominio de unión al antígeno o unión Fc-FcγR. Cualquier instrumento de SPR disponible en el comercio incluyendo, pero sin limitación, los instrumentos BIAcore, disponibles de Biacore AB (Uppsala, Suecia); los instrumentos IAsys disponibles de Affinity Sensors (Franklin, MA.); el sistema IBIS disponible de Windsor Scientific Limited (Berks, RU), los sistemas SPR-CELLIA disponibles de Nippon Laser y Electronics Lab (Hokkaido, Japón), y SPR Detector Spreeta disponible de Texas Instruments (Dallas, TX) se pueden usar. Para más información sobre la tecnología basada en SPR, véase Mullet et al. (2000) "Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays", Methods 22: 77-91; Dong et al. (2002) "Some new aspects in biosensors", Reviews in Mol. Biotech. 82: 303-23; Fivash et al. (1998) "BIAcore For Macromolecular Interaction", Current Opinion in Biotechnology 9: 97-101; Rich et al. (2000) "Advances In Surface Plasmon Resonance Biosensor Analysis", Current Opinion in Biotechnology 11: 54-61. Adicionalmente, cualquiera de los instrumentos SPR y los métodos basados en SPR para medir las interacciones proteína-proteína descritos en las patentes de EE. UU. números 6.373.577; 6.289.286; 5.322.798; 5.341.215; 6.268.125, se contemplan en los métodos del presente documento.

Resumiendo, los ensayos basados en SPR implican la inmovilización de un miembro de un par de unión en una superficie y el control de su interacción con el otro miembro del par de unión en solución y en tiempo real. El análisis de SPR se basa en la medición del cambio del índice de refracción del disolvente cerca de la superficie que sucede tras la formación o disociación del complejo. La superficie en la que ocurre la inmovilización es la microplaca de sensor, que está en el núcleo de la tecnología SPR; que consiste en una superficie de vidrio recubierta con una capa delgada de oro y que forma la base para una selección de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de una molécula a la superficie. En el mercado, se dispone de una variedad de microplacas, en especial, de las empresas que se han enumerado anteriormente, todos los cuales se pueden usar en los métodos del presente documento. Los ejemplos de microplacas de sensor incluyen las disponibles en BIAcore AB, Inc., por ejemplo, microplaca de sensor CM5, SA, NTA y HPA. Se puede inmovilizar una molécula de la divulgación sobre la superficie de un microplaca de sensor usando cualquiera de los métodos y las químicas de inmovilización que se conocen en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, el acoplamiento covalente directo mediante grupos amina, el acoplamiento covalente directo mediante grupos sulfhidrilo, la unión de biotina a una superficie recubierta con avidina, el

acoplamiento de aldehído a grupos hidrato de carbono y la unión mediante la marcador de histidina con microplacas de NTA.

En algunas realizaciones, los parámetros cinéticos de la unión de las moléculas de la divulgación que comprenden múltiples sitios de unión a epítopo y, opcionalmente, un dominio Fc, a un antígeno o un FcγR se pueden determinar usando un instrumento BIAcore (por ejemplo, instrumento BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Como se ha tratado anteriormente, véase el apartado 5.4.1, se puede usar cualquier FcγR para evaluar la unión de las moléculas descritas en el presente documento cuando al menos un sitio de unión a epítopo de la molécula de diacuerpo reconoce de manera inmunoespecífica un FcγR, y/o cuando la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc (o parte del mismo). En una realización específica, el FcγR es FcγRIIIA, preferentemente un FcγRNIA monomérico soluble. Por ejemplo, en una realización, el FcγRIIIA monomérico soluble es la región extracelular de FcγRIIIA unida a la secuencia enlazadora-AVITAG. En otra realización específica, el FcγR es FcγRIIB, preferentemente, un FcγRIIB dimérico soluble.

En todos los ensayos inmunológicos, el reconocimiento/la unión de FcγR con una molécula descrita en el presente documento se puede efectuar mediante múltiples dominios: en determinados ejemplos, las moléculas descritas en el presente documento reconocen de manera inmunoespecífica un FcγR a través de uno de los múltiples dominios de unión a epítopo; en otros ejemplos más, cuando la molécula descrita en el presente documento contiene un dominio Fc (o parte del mismo), la molécula de diacuerpo puede reconocer de manera inmunoespecífica un FcγR por las interacciones de Fc-FcγR; en otros ejemplos más, cuando una molécula descrita en el presente documento comprende un dominio Fc (o parte del mismo) y un sitio de unión a epítopo que reconoce de manera inmunoespecífica un FcγR, la molécula de diacuerpo puede reconocer un FcγR a través de un dominio de unión al epítopo o el dominio Fc (o parte del mismo). Un ensayo ilustrativo para determinar los parámetros cinéticos de una molécula que comprende múltiples dominios de unión al epítopo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo) a un antígeno y/o un FcγR usando un instrumento BIAcore, comprende lo siguiente: se inmoviliza un primer antígeno en una de las cuatro celdas de flujo de una superficie de microplaca de sensor, preferentemente mediante química de acoplamiento con amina de modo que aproximadamente 5.000 unidades de respuesta (UR) de dicho primer antígeno se inmovilicen en la superficie. Una vez que se prepara una superficie apropiada, las moléculas descritas en el presente documento que reconocen de manera inmunoespecífica el primer antígeno se pasan por la superficie, preferentemente, mediante inyecciones de un minuto de una solución 20 µg/ml a un caudal de 5 µl/ml. Los niveles de moléculas descritas en el presente documento unidas a la superficie en esta etapa normalmente varían entre 400 y 700 UR. A continuación, se inyectan series de diluciones de un segundo antígeno (por ejemplo, FcγR) o el receptor FcγR en el tampón HBS-P (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, pH 7,5) sobre la superficie a 100 µl/min. La regeneración de las moléculas entre diferentes diluciones del segundo antígeno o el receptor se lleva a cabo preferentemente mediante inyecciones individuales de 5 segundos de $NaHCO_3$ 100 mM, pH 9,4; NaCl 3 M. Cualquier técnica de regeneración conocida en la técnica se contempla en el método del presente documento.

Una vez que se recopila todo el conjunto de datos, las curvas de unión resultantes se ajustan de manera global usando algoritmos de cálculo suministrados por el fabricante del instrumento de SPR, por ejemplo, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan las constantes K_{on} y K_{off}, a partir de las que se deduce la constante de unión en equilibrio aparente, K_d se deduce como el cociente de las dos constantes de velocidad (es decir, K_{off}/K_{on}). Se pueden encontrar tratamientos más detallados de cómo se derivan cada una de las constantes de velocidad en el manual del software BIAevaluation (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). El análisis de los datos derivados se puede realizar usando cualquier método conocido en la técnica. Para más información sobre diversos métodos de interpretación de los datos cinéticos generados, véase Myszka (1997) "Kinetic Analysis Of Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance Biosensors", Current Opinion in Biotechnology 8: 50-7; Fisher et al. (1994) "Surface Plasmon Resonance Based Methods For Measuring The Kinetics And Binding Affinities Of Biomolecular Interactions", Current Opinion in Biotechnology 5: 389-95; O'Shannessy (1994) "Determination Of Kinetic Rate And Equilibrium Binding Constants For Macromolecular Interactions: A Critique Of The Surface Plasmon Resonance Literature", Current Opinion in Biotechnology, 5:65-71; Chaiken et al. (1992) "Analysis Of Macromolecular Interactions Using Immobilized Ligands", Analytical Biochemistry, 201: 197-210; Morton et al. (1995) "Interpreting Complex Binding Kinetics From Optical Biosensors: A Comparison Of Analysis By Linearization, The Integrated Rate Equation, And Numerical Integration", Analytical Biochemistry 227: 176-85; O'Shannessy et al., 1996, Analytical Biochemistry 236: 275-83.

En las realizaciones preferidas, los parámetros cinéticos determinados usando un análisis de SPR, por ejemplo, BIAcore, pueden usarse como una medida predictiva de cómo funcionará una molécula descrita en el presente documento en un ensayo funcional, por ejemplo, ADCC. Un método ilustrativo para predecir la eficacia de una molécula de la divulgación basándose en los parámetros cinéticos obtenidos de un análisis de SPR puede comprender lo siguiente: determinar los valores de K_{off} para la unión de una molécula descrita en el presente documento a FcγRIIIA y FcγRIIB (mediante un dominio de unión al epítopo y/o un dominio Fc (o parte del mismo)); representar gráficamente (1) K_{off} (de tipo silvestre)/K_{off} (mutante) para FcγRIIIA; (2) K_{off} (mutante)/K_{off} (de tipo silvestre) para FcγRIIB frente a los datos de ADCC. Los números superiores a uno muestran una menor velocidad de disociación para FcγRIIIA y una mayor velocidad de disociación para FcγRIIB respecto al de tipo silvestre; y presenta una función ADCC mejorada.

5.5 MÉTODOS PARA PRODUCIR MOLÉCULAS DE DIACUERPO DE LA INVENCIÓN

Las moléculas de diacuerpo de la presente invención pueden producirse usando diversos métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo la síntesis de proteína de novo y la expresión recombinante de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión. Las secuencia de ácidos nucleicos deseadas se pueden producir mediante métodos recombinantes (por ejemplo, mutagénesis por PCR de una variante previamente preparada del polinucleótido deseado) o mediante síntesis del ADN en fase sólida. Normalmente, se usan métodos de expresión recombinante. En un aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un VH y/o VL para CD16A de acuerdo con la reivindicación 1 del presente documento; en otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un VH y/o VL para CD32B de acuerdo con la reivindicación 1 del presente documento. A causa de la degeneración del código genético, una variedad de secuencias de ácido nucleico codifican cada secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, y la presente descripción incluye todos los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión descritas en el presente documento.

5.5.1 POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN LAS MOLÉCULAS DE LA INVENCIÓN

También se describen polinucleótidos que codifican las moléculas de la divulgación, incluyendo los polipéptidos y anticuerpos. Se pueden obtener los polinucleótidos que codifican las moléculas de la divulgación, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos se puede determinar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos de las moléculas que son identificadas mediante los métodos del presente documento, la secuencia de nucleótidos se puede modificar por ingeniería usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, *etc.* (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3.ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; y Ausubel et al., eds., 1998, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, NY), generando, por ejemplo, Anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, generando sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos.

En una realización, las bibliotecas humanas o cualquier otra biblioteca disponible en la técnica, pueden examinarse mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, para clonar los ácidos nucleicos que codifiquen las moléculas de la divulgación.

5.5.2 EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LAS MOLÉCULAS DE LA INVENCIÓN

Una vez que se ha obtenido una secuencia de ácido nucleico codifica moléculas de la divulgación (es decir,, anticuerpos), puede producirse el vector para la producción de las moléculas mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes para las moléculas de la divulgación y las señales de control de transcripción y traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. (Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2.ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel et al. eds., 1998, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, NY).

Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de una molécula identificada mediante los métodos del presente documento se puede transferir a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposomal y precipitación con fosfato de calcio) y cultivarse después las células transfectadas mediante las técnicas convencionales para producir las moléculas de la divulgación. En realizaciones específicas, la expresión de las moléculas de la divulgación está regulada por un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de tejido.

Las células hospedadoras que se usan para expresar las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento pueden ser células bacterianas tales como *Escherichia coli* o, preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de inmunoglobulina recombinante completa. En particular, células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como un elemento promotor mayor del gen temprano intermedio procedente del citomegalovirus humano son un sistema de expresión eficaz para las inmunoglobulinas (Foecking et al. (1986) "Powerful And Versatile Enhancer-Promoter Unit For Mammalian Expression Vectors", Gene 45:101-106; Cockett et al. (1990) "High Level Expression Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases In Chinese Hamster Ovary Cells Using Glutamine Synthetase Gene Amplification", Biotechnology 8:662-667).

Se puede utilizar una variedad de sistemas vectoriales de expresión en el hospedador para expresar las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento. Dichos sistemas de expresión en el hospedador representan vehículos mediante los que se pueden producir las secuencias de codificación de las moléculas de la divulgación y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o

transfectan con las secuencias que codifican los nucleótidos adecuados, expresan las moléculas de la divulgación *in situ*. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis)* transformado con ADN de bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN plásmido o ADN cósmido que contienen secuencias codificantes para las moléculas identificadas por los métodos del presente documento; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces, Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias que codifican las moléculas identificadas por los métodos del presente documento; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión recombinante de virus (por ejemplo, baculovirus) que contengan las secuencias codificantes de las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico del tabaco (TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias que codifican las moléculas identificadas por los métodos del presente documento; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, COS, CHO, BHK, 293, 293T, células 3T3, células linfocíticas (véase el documento US 5.807.715), células Per C.6 (células retinianas humanas desarrolladas por Crucell) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus); el promotor 7.5K del virus vaccinia).

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar de forma ventajosa una serie de vectores de expresión dependiendo del uso previsto de la molécula que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, se pueden desear vectores que dirijan la expresión de elevados niveles de productos de proteínas de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, aunque sin limitación, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Rüther et al. (1983) "Easy Identification Of cDNA Clones", EMBO J. 2:1791-1794), en el que la secuencia que codifica el anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región que codifica *lac Z* de manera que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye et al. (1985) "Up-Promoter Mutations In The Ipp Gene Of Escherichia Coli", Nucleic Acids Res. 13:3101-3110; Van Heeke et al. (1989) "Expression Of Human Asparagine Synthetase In Escherichia Coli", J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. Se pueden usar también vectores pGEX para expresar los polipéptido foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a perlas de una matriz de glutatión-agarosa seguido por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de la proteasa de la trombina o de la proteasa del factor Xa de tal manera que el producto del gen diana clonado puede liberarse del resto GST.

En un sistema de insecto, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica el anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

En células hospedadoras de mamífero, se pueden utilizar numerosos sistemas de expresión basados en virus. En los casos donde se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia que codifica el anticuerpo de interés se puede ligar a un complejo de control de la transcripción/traducción adenovírico, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. A continuación, se puede insertar este gen quimérico en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan et al. (1984) "Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation Of mRNAs Late After Infection", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659). Para la traducción eficaz de las secuencias codificantes de anticuerpos insertadas también pueden ser necesarias señales de inicio específicas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de toda la inserción. Estas señales de control de la traducción exógenas y los codones de inicio pueden ser de una variedad de orígenes, naturales y sintéticos. La eficacia de expresión se puede mejorar mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (Véase Bitter et al. (1987) "Expression And Secretion Vectors For Yeast", Methods in Enzymol. 153:516-544).

Además, se puede seleccionar una cepa de célula hospedadora que module o modifique la expresión de las secuencias insertadas y procese el producto génico en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos de la proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los polipéptidos que comprenden una molécula de diacuerpo de la divulgación se pueden expresar como un solo producto génico (por ejemplo, como una sola cadena polipeptídica, es decir, como precursor de poliproteína), que requiere la escisión proteolítica mediante mecanismos celulares nativos o recombinantes para formar polipéptidos separados de las moléculas de diacuerpo de la divulgación. También se describe la modificación por ingeniería de una secuencia de ácido nucleico para codificar una molécula precursora de poliproteína que contenga los polipéptidos de la divulgación, que incluye secuencias codificantes capaces de dirigir la escisión posterior a la traducción del precursor de poliproteína. La escisión posterior a la traducción del precursor de poliproteína produce los polipéptidos de la

divulgación. La escisión postraduccional de la molécula precursora que comprende los polipéptidos de la divulgación puede ocurrir *in vivo* (es decir, dentro de la célula hospedadora mediante sistemas/mecanismos de células nativas o recombinantes, por ejemplo, escisión de furina en un sitio apropiado) o puede ocurrir *in vitro* (por ejemplo, la incubación de dicha cadena polipeptídica en una composición que comprende proteasas o peptidasas de actividad conocida y/o en una composición que comprende condiciones o reactivos que se sabe que fomentan la acción proteolítica deseada). La purificación y modificación de las proteínas recombinantes es bien conocida en la técnica, de modo que el diseño del precursor de poliproteína podría incluir una serie de realizaciones fáciles de apreciar por el trabajador experto. Cualquiera de las proteasas o peptidasas conocidas en la técnica se puede usar para la modificación descrita de la molécula precursora, por ejemplo, trombina (que reconoce la secuencia de aminoácidos LVPR^GS (SEQ ID NO: 89)), o el factor Xa (que reconoce la secuencia de aminoácidos I(E/D)GR^ (SEQ ID NO:90) (Nagai et al. (1985) "Oxygen Binding Properties Of Human Mutant Hemoglobins Synthesized In Escherichia Coli", Proc. Nat. Acad. Sci.USA 82:7252-7255, y revisado en Jenny et al. (2003) "A Critical Review Of The Methods For Cleavage Of Fusion Proteins With Thrombin And Factor Xa", Protein Expr. Purif. 31:1-11)), enterocinasa (que reconoce la secuencia de aminoácidos DDDDK^ (SEQ ID NO: 91) (Collins-Racie et al. (1995) "Production Of Recombinant Bovine Enterokinase Catalytic Subunit In Escherichia Coli Using The Novel Secretory Fusion Partner DsbA", Biotechnology 13:982-987)), furina (que reconoce la secuencia de aminoácidos RXXR^, con preferencia por RX(K/R)R^ (SEQ ID NO:92 y SEQ ID NO:93, respectivamente) (R adicional en la posición P6 parece potenciar la escisión)), y AcTEV (que reconoce la secuencia de aminoácidos ENLYFQ^G (SEQ ID NO:94) (Parks et al. (1994) "Release Of Proteins And Peptides From Fusion Proteins Using A Recombinant Plant Virus Proteinase", Anal. Biochem. 216:413-417)) y la proteasa C3 del virus de la fiebre aftosa. Véanse, por ejemplo, apartado 6.4, *anteriormente citado.*

Diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y la modificación posterior a la traducción de las proteínas y productos génicos. Se pueden seleccionar estirpes de células adecuadas o sistemas hospedadores para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Con este fin, se pueden usar células hospedadoras eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, la glucosilación y la fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, pero sin limitación, células CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

Para producción a largo y con alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden modificar por ingeniería las estirpes celulares que expresan de manera estable un anticuerpo de la divulgación. En lugar de usar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación víricos, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión adecuados (por ejemplo, promotores, potenciadores, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN foráneo, pueden dejarse crecer las células modificadas mediante ingeniería durante 1-2 días en un medio enriquecido, y a continuación, cambiarse a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que, a la vez, puedan clonarse y expandirse en estirpes de células. Este método se puede usar de forma ventajosa para modificar mediante ingeniería estirpes de células que expresen los anticuerpos de la divulgación. Dichas estirpes de células modificadas mediante ingeniería pueden ser particularmente útiles en la exploración y la evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con las moléculas de la divulgación.

Se puede usar una serie de sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitación, los genes de timidina cinasa del virus de herpes simple (Wigler et al. (1977) "Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells", Cell 11: 223-232), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska et al. (1992) "Use Of The HPRT Gene And The HAT Selection Technique In DNA-Mediated Transformation Of Mammalian Cells: First Steps Toward Developing Hybridoma Techniques And Gene Therapy", Bioessays 14: 495-500) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al. (1980) "Isolation Of Transforming DNA: Cloning The Hamster aprt Gene", Cell 22: 817-823) genes que se pueden emplear en células tk-, hgprt o aprt, respectivamente. Asimismo, se puede usar la resistencia antimetabolitos como la base de selección de los siguientes genes: *dhfr,* que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al. (1980) "Transformation Of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570; O'Hare et al. (1981) "Transformation Of Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihydrofolate Reductase", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527-1531); *gpt,* que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan et al. (1981) "Selection For Animal Cells That Express The Escherichia coli Gene Coding For Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072-2076); *neo,* confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Tolstoshev (1993) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions", Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) "The Basic Science Of Gene Therapy", Science 260:926-932; y Morgan et al. (1993) "Human Gene Therapy", Ann. Rev. Biochem. 62:191-217) e *hygro,* que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al. (1984) "Expression Of Prokaryotic Genes For Hygromycin B And G418 Resistance As Dominant-Selection Markers In Mouse L Cells", Gene 30:147-156). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel et al. (eds.), 1993, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley

& Sons, NY.; Colberre-Garapin et al. (1981) "A New Dominant Hybrid Selective Marker For Higher Eukaryotic Cells", J. Mol. Biol. 150:1-14.

Se pueden aumentar los niveles de expresión de una molécula de la divulgación mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, Nueva York, 1987). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresa un anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedadora aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con la secuencia de nucleótidos de un polipéptido de la molécula de diacuerpo, también aumentará la producción del polipéptido (Crouse et al. (1983) "Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes", Mol. Cell. Biol. 3:257-266).

La célula hospedadora puede transfectarse simultáneamente con dos vectores de expresión, codificando el primer vector el primer polipéptido de la molécula de diacuerpo, y codificando el segundo vector el segundo polipéptido de la molécula de diacuerpo. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permitan la expresión de ambos polipéptidos. Como alternativa, se puede usar un solo vector que codifique ambos polipéptidos. Las secuencias codificantes para los polipéptidos de las moléculas de la divulgación pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que una molécula de la divulgación (es decir,, diacuerpos) se ha expresado de forma recombinante, se puede purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de polipéptidos, poliproteínas o diacuerpos (por ejemplo, análogos a los esquemas de purificación de anticuerpos basados en la selectividad del antígeno), por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico (opcionalmente después de la selección de la Proteína A donde la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc (o parte del mismo)), y cromatografía en columna de separación por tamaños), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de polipéptidos, poliproteínas o diacuerpos.

5.6 MÉTODOS PROFILÁCTICOS Y TERAPÉUTICOS

Las moléculas de la divulgación son particularmente útiles para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, trastorno o infección donde se desea una función de las células efectoras (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR (por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa). Como se ha tratado anteriormente, los diacuerpos de la invención pueden presentar funcionalidad de tipo anticuerpo para generar una función efectora, aunque la molécula de diacuerpo no comprenda un dominio Fc. Al comprender al menos un dominio de unión al epítopo que reconozca de manera inmunoespecífica un FcγR, la molécula de diacuerpo puede presentar unión a FcγR y actividad análogas a las interacciones de Fc-FcγR. Por ejemplo, las moléculas de la divulgación pueden unirse a un antígeno de superficie celular y un FcγR (por ejemplo, FcγRIIIA) en una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, linfocito NK), estimulando una función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc.) contra dicha célula.

También se describe que, la molécula de diacuerpo descrita en el presente documento comprende un dominio Fc (o parte del mismo). En dichas realizaciones, el dominio Fc puede comprender además al menos una modificación de aminoácido en relación con el dominio Fc de tipo silvestre (o parte del mismo) y/o puede contener dominios de uno o más isotipos de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Las moléculas de la invención que comprenden dominios Fc variantes pueden presentar fenotipos conferidos o modificados con respecto a las moléculas que comprenden el dominio Fc de tipo silvestre, tal como una actividad de función efectora modificada o conferida (por ejemplo, ensayada en un ensayo dependiente de linfocitos NK o dependiente de macrófagos). Además, las moléculas descritas en el presente documento con actividad de función efectora conferida o modificada son útiles para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, un trastorno o una infección cuando se desea una eficacia mejorada de la actividad de la función efectora. Como alternativa, las moléculas de diacuerpo descritas en el presente documento que comprenden un dominio Fc (o parte del mismo) median en la cascada dependiente del complemento. Las variantes del dominio Fc identificadas como modificadoras de la función efectora se desvelan en la solicitud internacional WO04/063351, las publicaciones de solicitudes de patente de los Estados Unidos 2005/0037000 y 2005/0064514 y las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2006-0134709 A1, presentada el 10 de noviembre de 2005, y 2006-0177439 A1, presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitudes concurrentes de los inventores.

También se describen métodos y composiciones para el tratamiento, la prevención o el control de un cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas que comprenden uno o más sitios de unión al epítopo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo) diseñado como se describe en el presente documento, molécula que se una a un antígeno del cáncer. Las moléculas de la divulgación son particularmente útiles para la prevención, la inhibición, la reducción del crecimiento o la regresión de tumores primarios, metástasis de células cancerosas y enfermedades infecciosas. Aunque no se pretende quedar limitado a ningún mecanismo de acción en particular, las moléculas de la divulgación median en la función efectora produciendo el aclaramiento del tumor, la disminución del tumor o una combinación de los mismos. En realizaciones alternativas, los diacuerpos de la divulgación median en la actividad terapéutica mediante reticulación de antígenos

y/o receptores de superficie celular y potencian la apoptosis o la señalización de los reguladores negativos del crecimiento.

Aunque no se pretende quedar limitado a ningún mecanismo de acción en particular, las moléculas de diacuerpo de la divulgación presentan una mejor eficacia terapéutica con respecto a los anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica, en parte, debido a la capacidad del diacuerpo de unirse de manera inmunoespecífica a una célula diana que exprese un antígeno específico (por ejemplo, FcγR) a niveles reducidos, por ejemplo, en virtud de la capacidad del diacuerpo de permanecer en la célula diana más tiempo debido a una mejor avidez de la interacción de diacuerpo-epítopo.

Los diacuerpos de la divulgación con mejores afinidad y avidez por los antígenos (por ejemplo, FcγR) son particularmente útiles para el tratamiento, la prevención o el control de un cáncer, u otras enfermedades o trastornos, en un sujeto, en el que los FcγR se expresan a niveles bajos en las poblaciones de células diana. Como se usa en el presente documento, la expresión de FcγR en células se define en términos de la densidad de dichas moléculas por célula, medida usando los métodos comunes conocidos por los expertos en la materia. Las moléculas descritas en el presente documento que comprenden múltiples sitios de unión a epítopos y, opcionalmente, un FcγR (o parte del mismo) preferentemente también tienen una avidez y afinidad y/o función efectora conferida o potenciada en células que expresan un antígeno diana, por ejemplo, un antígeno del cáncer, a una densidad de 30.000 a 20.000 moléculas/célula, a una densidad de 20.000 a 10.000 moléculas/célula, a una densidad de 10.000 moléculas/célula o inferior, a una densidad de 5.000 moléculas/célula o inferior o a una densidad de 1.000 moléculas/célula o inferior. Las moléculas de la divulgación tienen utilidad particular para el tratamiento, la prevención o el control de una enfermedad o de un trastorno, tales como el cáncer, en una subpoblación, en las que el antígeno diana se expresa a niveles bajos en la población de células diana.

Las moléculas de la divulgación también se pueden utilizar ventajosamente en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos por el tratamiento o la prevención de enfermedades, tales como el cáncer, enfermedad autoinmunitaria, trastornos inflamatorios y enfermedades infecciosas. las moléculas de la divulgación pueden usarse en combinación con anticuerpos monoclonales o quiméricos, linfocinas o factores de crecimiento hematopoyético (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 e IL-7), que, por ejemplo, sirven para aumentar el número o la actividad de las células efectoras que interactúan con las moléculas y aumentar la respuesta inmune. Las moléculas de la divulgación también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con uno o más fármacos utilizados para tratar una enfermedad, trastorno o infección tal como, por ejemplo, agentes anticancerosos, agentes antiinflamatorios o agentes antivirales, por ejemplo, como se detalla en el apartado 5.7.

5.6.1 CÁNCERES

También se describen métodos y composiciones para el tratamiento o la prevención del cáncer en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas que comprenden múltiples dominios de unión a epítopo. También se describen métodos y composiciones para el tratamiento o la prevención del cáncer en un sujeto con polimorfismos de FcγR, como los homocigotos para los alelos FγKIIIA-158V o FcγKIIIA-158F. También se describe la ingeniería de al menos un dominio de unión a epítopo de la molécula de diacuerpo para unirse inmunoespecíficamente a FcγRIIIA (158F). También se describe la ingeniería de al menos un dominio de unión a epítopo de la molécula de diacuerpo para unirse inmunoespecíficamente a FcγRIIIA (158V).

La eficacia de la terapia convencional con anticuerpos monoclonales depende del polimorfismo del FcγR del sujeto (Cartron et al. (2002) "Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In IgG Fc Receptor FcRIIIa Gene", Blood 99: 754-758; Weng et al. (2003) "Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma", J Clin Oncol. 21(21):3940-3947). Estos receptores son expresados en la superficie de células efectoras y median en la ADCC. Los alelos de alta afinidad de los receptores activadores de baja afinidad, mejoran la capacidad de las células efectoras para intervenir en la ADCC. Al contrario que la dependencia de las interacciones de Fc-FcγR para efectuar la función efectora, los métodos del presente documento abarcan la ingeniería de moléculas para reconocer inmunoespecíficamente los receptores de activación de baja afinidad, permitiendo que las moléculas sean diseñadas para un polimorfismo específico. Como alternativa o además, la molécula descrita en el presente documento puede modificarse por ingeniería para que comprenda un dominio Fc variante que presente afinidad potenciada para FcγR (con respecto a un dominio Fc de tipo silvestre) en las células efectoras. Las moléculas modificadas por ingeniería descritas en el presente documento proporcionan mejores reactivos para inmunoterapia para tratar a pacientes, independientemente de su polimorfismo de FcγR.

Las moléculas de diacuerpo modificadas por ingeniería de acuerdo con la divulgación se analizan mediante ADCC usando una estirpe celular cultivada o células PMBC derivadas del paciente para determinar la capacidad de las mutaciones Fc para potenciar la ADCC. La técnica ADCC convencional se realiza usando los métodos que se desvelan en el presente documento. Se recogen linfocitos de sangre periférica usando un gradiente Ficoll-Paque (Pharmacia). Células diana, es decir, las estirpes celulares cultivadas o células derivadas del paciente, se cargan con europio (PerkinElmer) y se incuban con los efectores durante 4 h a 37 ºC. El europio liberado es detectado usando un lector de placas fluorescentes (Wallac). Los datos de ADCC resultantes indican la eficacia de las

moléculas de la divulgación para generar la citotoxicidad mediada por los linfocitos NK y establecer qué moléculas pueden ser analizarse con las muestras del paciente y monocitos elutriados. A continuación, se analizan las moléculas de diacuerpo que presenten el potencial más alto para generar la actividad ADCC en un ensayo ADCC usando las PBMC de los pacientes. Como células efectoras, se usan células PBMC de donantes sanos.

También se describen métodos de prevención o tratamiento del cáncer caracterizado por un antígeno del cáncer, modificando por ingeniería la molécula de diacuerpo para que reconozca de manera inmunoespecífica el antígeno del cáncer, de modo que la molécula de diacuerpo sea por sí misma citotóxica (por ejemplo, mediante los reticulación de los receptores de superficie que conducen a la apoptosis o regulación negativa aumentada de señales proliferativas) y/o comprende un dominio Fc, de acuerdo con la divulgación, y/o media en una o más funciones efectoras (por ejemplo, ADCC, fagocitosis). Los diacuerpos que han sido diseñados de acuerdo con la divulgación son útiles para la prevención o el tratamiento del cáncer, puesto que estos tienen una actividad citotóxica (por ejemplo, mayor capacidad de destrucción de las células tumorales y/o mejor, por ejemplo, actividad ADCC o CDC).

Los cánceres asociados con un antígeno del cáncer pueden tratarse o prevenirse mediante la administración de un diacuerpo que se una a un antígeno del cáncer y sea citotóxico, y/o haya sido modificado por ingeniería de acuerdo con los métodos del presente documento para presentar una función efectora. Por ejemplo, pero sin limitación, los cánceres asociados con los siguientes antígenos del cáncer se pueden tratar o prevenir con los métodos y composiciones descritos: antígeno de pan-carcinoma KS 1/4 (Perez et al. (1989) "Isolation And Characterization Of A Cdna Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker", J. Immunol. 142:3662-3667; Möller et al. (1991) "Bispecific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes", Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu et al. (1991) "Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants", Cancer Res. 51(2):468-475), fosfato ácido prostático (Tailor et al. (1990) "Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone", Nucl. Acids Res. 18(16):4928), antígeno específico de próstata (Henttu et al. (1989) "cDNA Coding For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes", Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli et al. (1993) "Molecular Cloning Of A Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen", Cancer Res. 53:227-230), antígeno p97 asociado a melanoma (Estin et al. (1989) "Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97", J. Natl. Cancer Inst. 81(6):445-454), antígeno gp75 de melanoma (Vijayasardahl et al. (1990) "The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product", J. Exp. Med. 171(4):1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali et al. (1987) "Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance", Cancer 59:55-63; Mittelman et al. (1990) "Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies", J. Clin. Invest. 86:2136-2144)), antígeno de membrana específico de la próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon et al. (1995) "Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotype Antibody Vaccine", J. Clin. Invest. 96(1):334-42), antígeno de mucina epitelial polimórfica, antígeno de glóbulos grasos de leche humana, antígenos asociados con tumor colorrectal tales como: CEA, TAG-72 (Yokota et al. (1992) "Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms", Cancer Res. 52:3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar et al. (1993) "Effect Of Monoclonal Antibody 17-1A And GM-CSF In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma - Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced", Int. J. Cancer 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn et al. (1982) "Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma", J. Clin. Immunol. 2:135-140), CTA-1 y LEA, antígeno de linfoma de Burkitt-38.13, CD19 (Ghetie et al. (1994) "Anti-CD19 Inhibits The Growth Of Human B-Cell Tumor Lines In Vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest", Blood 83:1329-1336), antígeno de linfoma B humano CD20 (Reff et al. (1994) "Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20", Blood 83:435-445), CD33 (Sgouros et al. (1993) "Modeling And Dosimetry Of Monoclonal Antibody M195 (Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia", J. Nucl. Med. 34:422-430), antígenos específicos de melanoma tales como gangliósido GD2 (Saleh et al. (1993) "Generation Of A Human Anti-Idiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen", J.Immunol., 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara et al. (1993) "A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3) Antibody With Enhanced Antitumor Activities", Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380), gangliósido GM2 (Livingston et al. (1994) "Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside", J. Clin. Oncol. 12:1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon et al. (1993) "Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers", Cancer Res. 53:5244-5250), antígeno superficial celular de tipo trasplante específico de tumor (TSTA) tal como antígenos tumorales inducidos víricamente incluyendo virus de tumores de ADN de antígeno T y antígenos de envolturas de virus de tumores de ARN, alfa-fetoproteína de antígeno oncofetal tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellström et al. (1985) "Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas", Cancer. Res. 45:2210-2188), antígeno de diferenciación tal como antígeno L6 de carcinoma de pulmón humano, L20 (Hellström et al. (1986) "Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma", Cancer Res. 46:3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígenoGp37 de linfocito T de leucemina humana (Bhattacharya-Chatterjee et al. (1988) "Idiotype Vaccines Against Human T Cell

Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotype Cascade (Ab1, Ab2, and Ab3)", J. Immunol. 141:1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama tal como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), Antígeno HER2 ($p185^{HER2}$), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens et al. (1992) "Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property", Trends in Biochem. Sci. 17:359-363), antígeno APO-1 de linfocito humano maligno (Trauth et al. (1989) "Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis", Science 245:301-304), antígeno de diferenciación (Feizi (1985) "Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens", Nature 314:53-57) tales como el antígeno I encontrado en eritrocitos fetales y endodermo primario, I(Ma) encontrado en adenocarcinomas gástricos, M18 y M39 encontrados en epitelio mamario, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 y D.,56-22 encontrados en el cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma colónico, F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Le^y encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF encontrado en células A431, serie E.| (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer de páncreas, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embriónico, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en el adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49, receptor del EGF, (grupo sanguíneo ALe^b/Le^y) encontrado en adenocarcinoma de colon, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T_5A_7 encontrado en las células mieloides, R_{24} encontrado en melanoma, 4,2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, M1:22:25:8 encontrado en células de carcinoma embrionario y SSEA-3, SSEA-4 encontrados en embriones en fase de 4-8 células. En otra realización, el antígeno es un péptido derivado del receptor de linfocitos T de un linfoma de linfocitos T cutáneos (véase, Edelson (1998) "Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy", Cancer J Sci Am. 4:62-71).

Los cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse o prevenirse mediante los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, los siguientes: leucemias que incluyen, pero sin limitación, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas, tales como leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritoleucemia, leucemias y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas incluyendo, pero sin limitación, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfomas, incluyendo pero sin limitación, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, pero sin limitación, mieloma indolente, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom; gammapatía monoclonal de significado indeterminado; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada; sarcomas óseos y de tejido conjuntivo, tales como sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma óseo, cordoma, sarcoma del periostio, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales incluyendo, pero sin limitación, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma de cerebro primario; cáncer de mama, incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, incluyendo, pero sin limitación, feocromocitoma y carcinoma corticosuprarrenal; cánceres de tiroides tales como, pero sin limitación, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer de páncreas, incluyendo, pero sin limitación, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor de células de los islotes o carcinoide; cáncer hipofisario incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cáncer de ojos incluyendo, pero sin limitación, melanoma ocular tal como melanoma del iris, melanoma coroideo y melanoma del cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cánceres de vagina, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer de vulva, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres cervicouterinos incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres de útero, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma endometrial y sarcoma de útero; cánceres de ovario, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma epitelial de ovario, tumor limítrofe, tumor de células germinales y tumor estromal; cánceres esofágicos, incluyendo, pero sin limitación, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma cítico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrucoso y carcinoma de células de avena (células pequeñas); cánceres de estómago incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, hongo (polipoide), ulceración, diseminación superficial, diseminación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres hepáticos incluyendo, pero sin limitación, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de vesícula biliar incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma; colangiocarcinomas, incluyendo, pero sin limitación, de tipo papilar, nodular y difuso; cáncer de pulmón, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón microcítico; cánceres de testículo, incluyendo, pero sin limitación, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embriónico, carcinoma teratómico, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, leiomiosarcoma y rabdomiosarcoma; cánceres del pene; cánceres bucales incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células

escamosas; cánceres basales; cánceres de glándulas salivales incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoidquístico; cánceres de faringe, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de células escamosas y verrugoso; cánceres de piel, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma maligno lentigo, melanoma acral lentiginoso; cánceres renales, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefroma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (pelvis renal y/o uréter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células transicionales, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para más información sobre dichos trastornos, véase, Fishman et al. (1985) Medicine, 2.ª Ed., J.B. Lippincott Co., Filadelfia; y Murphy et al. (1997) Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books EE.UU., Inc., Estados Unidos de América).

Por consiguiente, Los métodos y composiciones descritos en el presente documento también son útiles en el tratamiento o prevención de una variedad de cánceres u otras enfermedades proliferativas anormales, incluyendo (pero sin limitación) los siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, próstata, cuello del útero, tiroides y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rabdomioscarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. También se contempla que los cánceres ocasionados por aberraciones de la apoptosis también serían tratados mediante los métodos y las composiciones descritos en el presente documento. Dichos cánceres pueden incluir, pero sin limitación, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53, tumores de mama, próstata y ovario dependientes de hormonas y lesiones precancerosas, tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, el tumor maligno o los cambios disproliferativos (tales como metaplasias y displasias) o trastornos hiperproliferativos, se tratan y previenen mediante los métodos y las composiciones descritos en el presente documento en el ovario, vejiga, mama, colon, pulmón, piel, páncreas o útero. En otras realizaciones específicas, sarcoma, el melanoma o la leucemia se trata o previene mediante los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

En una realización específica, una molécula descrita en el presente documento (por ejemplo, un diacuerpo que contenga múltiples dominios de unión a epítopo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo)) inhibe o disminuye el crecimiento de células cancerosas en al menos el 99 %, al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, al menos un 50 %, al menos un 45 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 35 %, al menos un 30 %, al menos un 25 %, al menos un 20 % o al menos un 10 % con respecto al crecimiento de células cancerosas en ausencia de dicha molécula descrita en el presente documento.

En una realización específica, una molécula descrita en el presente documento (por ejemplo, un diacuerpo que contenga múltiples dominios de unión a epítopo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo)) destruye las células, o inhibe o disminuye el crecimiento de células cancerosas en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 100 % mejor que la molécula precursora.

5.6.2 ENFERMEDAD AUTOINMUNE Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

En algunas realizaciones, las moléculas descritas en el presente documento comprenden un dominio de unión al epítopo específico para FcγRIIB y/o un dominio Fc variante (o parte del mismo), Modificado por ingeniería de acuerdo con los métodos del presente documento, presentando dicho dominio Fc mayor afinidad por FcγRIIB y menor afinidad por FcγRIIIA y/o FcγRIIA con respecto al a dominio Fc de tipo silvestre. Las moléculas descritas en el presente documento con dichas características de unión son útiles para regular la respuesta inmunitaria, por ejemplo, para inhibir la respuesta inmunitaria en relación con enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias. Aunque no se pretende restringirse a ningún mecanismo de acción, las moléculas de la divulgación con una afinidad por FcγRIIB y/o que comprenden un dominio Fc con una mayor afinidad por FcγRIIB y una menor afinidad por FcγRIIIA y/o FcγRIIA pueden conducir a atenuar la respuesta activadora frente a FcγR y a la inhibición de la capacidad de respuesta celular, y, por tanto, tienen eficacia terapéutica para tratar y/o prevenir un trastorno autoinmunitario.

También se describen métodos para prevenir, tratar o controlar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto además comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios. También se describen métodos para la prevención, el tratamiento o el control de uno o más síntomas asociados con una enfermedad autoinmune además comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores. El apartado 5.7 proporciona los ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios y agentes inmunomoduladores.

Los ejemplos de las enfermedades autoinmunes que se pueden tratar administrando las moléculas de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmune de Addison, enfermedades autoinmunes de las glándulas suprarrenales, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmunes, trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, pénfigo ampolloso, cardiomiopatía, esprúe celiaco-dermatitis, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (CFIDS), Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, Síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, Síndrome de CREST, enfermedad de las aglutininas frías, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, Enfermedad de Graves, enfermedad de Guillain-Barre, Tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía de IgA, artritis juvenil, líquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad del tejido conectivo mixto, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo 1 y mediada por el sistema inmunitario, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, Psoriasis, Artritis psoriásica, fenómeno de Raynauld, Síndrome de Reiter, Artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, Síndrome de Sjöegren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de gigantocitos, colitis ulcerosa, uveítis, Vasculitis tal como vasculitis herpetiforme con dermatitis, vitíligo y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero sin limitación, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones víricas o bacterianas crónicas. Como se describe en el apartado 2.2.2., algunos trastornos autoinmunes se asocian con un estado inflamatorio. Por lo tanto, existe un solapamiento entre lo que se considera un trastorno autoinmune y un trastorno inflamatorio. Por tanto, algunos trastornos autoinmunes también pueden caracterizarse como trastornos inflamatorios. Los ejemplos de los trastornos inflamatorios que pueden prevenirse, tratarse o controlarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones víricas o bacterianas crónicas.

Las moléculas descritas en el presente documento que comprenden al menos un dominio de unión al epítopo específico para FcγRIIB y/o un dominio Fc variante con una afinidad potenciada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA también pueden usarse para disminuir la inflamación que experimentan los animales, particularmente mamíferos, con trastornos inflamatorios. En una realización específica, una molécula de la divulgación reduce la inflamación en un animal en al menos un 99 %, al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, al menos un 50 %, al menos un 45 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 35 %, al menos un 30 %, al menos un 25 %, al menos un 20 % o al menos un 10 % con respecto a la inflamación en un animal, al que no se haya administrado dicha molécula.

Las moléculas descritas en el presente documento que comprenden al menos un dominio de unión al epítopo específico para FcγRIIB y/o un dominio Fc variante con afinidad potenciada por FcγRIIB y afinidad disminuida por FcγRIIIA también pueden usarse para prevenir el rechazo a trasplantes.

5.6.3 ENFERMEDADES INFECCIOSAS

También se describen métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas de la divulgación que comprenden al menos un dominio de unión al epítopo específico para un agente infeccioso asociado con dicha enfermedad infecciosa. En determinadas realizaciones, las moléculas de la divulgación son tóxicas para un agente infeccioso, potencian la respuesta inmunitaria contra dicho agente o potencian la función efectora contra dicho agente, en comparación con la respuesta inmunitaria en ausencia de dicha molécula. Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse con las moléculas de la divulgación son ocasionadas por agentes infecciosos incluyendo, pero sin limitación, virus, bacterias, hongos, protozoos y virus.

Las enfermedades víricas que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la divulgación en combinación con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, las causadas por el virus de la hepatitis de tipo A, hepatitis de tipo B, hepatitis de tipo C, gripe, varicela, adenovirus, herpes simple de tipo I (VSH-I), herpes simple de tipo II (VSH-II), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus del papiloma, papovavirus, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, virus coxsackie, virus de las paperas,

virus del sarampión, virus de la rubeola, virus de la polio, viruela, virus de Epstein Barr, virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I (VIH-I), virus de la inmunodeficiencia humana de tipo II (VIH-II) y agentes de enfermedades víricas tales como meningitis vírica, encefalitis, dengue o viruela.

Las enfermedades bacterianas que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la divulgación en combinación con los métodos descritos en el presente documento, que son ocasionadas por bacterias incluyen, pero sin limitación, micobacterias *rickettsia*, micoplasma, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Bacillus antracis* (carbunco), tétanos, estreptococos, estafilococos, micobacterias, tétanos, *Pertissus*, cólera, peste, difteria, clamidia, *S. aureus* y legionela.

Las enfermedades protozoarias que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la divulgación en combinación con los métodos descritos en el presente documento, que son ocasionadas por protozoos incluyen, pero sin limitación, *Leishmania*, *Kokzidioa*, tripanosoma o malaria.

Las enfermedades parasitarias que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la divulgación en combinación con los métodos descritos en el presente documento, que son ocasionadas por parásitos incluyen, pero sin limitación, *Chlamydia* y *Rickettsia*.

De acuerdo con un aspecto de la divulgación, las moléculas de la divulgación que comprenden al menos un dominio de unión al epítopo específico para un agente infeccioso presentan una función efectora de anticuerpo hacia dicho agente, por ejemplo, una proteína patógena. Los ejemplos de agentes infecciosos incluyen, pero no se limitan a, bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecials, Candida albicans, Proteus vulgaris, Staphylococcus viridans,* y *Pseudomonas aeruginosa),* un patógeno (por ejemplo, papovavirus B-linfotrópico (PVL); *Bordatella pertussis*; virus de la enfermedad de Borna (VEB); coronavirus bovino; virus de coriomeningitis; virus del Dengue; un virus, *E. coli*; ébola; ecovirus-1; ecovirus-11 (EV); endotoxina (LPS); bacteria entérica; virus huérfano entérico; enterovirus; virus de leucemia felina; virus de la fiebre aftosa; virus de leucemia del mono gibón (VLMG); bacterias gram-negativas; *Helicobacter pylori*; virus de la hepatitis B (VHB); virus del herpes simple; HIV-1; citomegalovirus humano; coronovirus humano; gripe A, B y C; legionela; *Leishmania mexicana*; *Listeria monocytogenes*; virus del sarampión; meningococos; morbilivirus; virus de la hepatitis de ratón; virus de la leucemia murina; gammaherpesvirus murino; retrovirus murino; coronavirus murino, virus de la hepatitis de ratón; *Mycobacterium avium*-M; *Neisseria gonorrhoeae*; virus de la enfermedad de Newcastle; Parvovirus B19; *Plasmodium falciparum*; virus de la viruela; *Pseudomonas*; Rotavirus; *Samonella typhiurium*; *Shigella*; estreptococos; virus linfotrópico de linfocitos T 1; virus vaccinia).

5.6.4 DETOXIFICACIÓN

El uso puede ser en métodos de detoxificación en un sujeto expuesto a una toxina (por ejemplo, una molécula farmacológica tóxica) que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas de la divulgación que comprenden al menos un dominio de unión al epítopo específico para la molécula farmacológica tóxica. En determinadas realizaciones, la unión de una molécula de la divulgación a la toxina reduce o elimina el efecto fisiológico adverso de dicha toxina. En otras realizaciones más, la unión de un diacuerpo de la divulgación a la toxina aumenta o potencia la eliminación, degradación o neutralización de la toxina con comparación con la eliminación, degradación o neutralización en ausencia de dicho diacuerpo. La inmunotoxicoterapia de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento puede usarse para tratar sobredosis o exposición a fármacos incluyendo, pero sin limitación, digoxina, PCP, cocaína, colchicina y antidepresivos tricíclicos.

5.7 TRATAMIENTO COMBINADO

También se describe la administración de las moléculas de la divulgación en combinación con otras terapias conocidas por los expertos en la técnica para el tratamiento o la prevención del cáncer. enfermedad autoinmunitaria, enfermedades infecciosas o intoxicación, incluyendo, pero sin limitación, quimioterapias experimentales y convencionales actuales, terapias hormonales, terapias biológicas, inmunoterapias, radioterapias o cirugía. En algunas realizaciones, las moléculas de la divulgación pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes, anticuerpos terapéuticos u otros agentes conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad infecciosa o intoxicación.

En determinadas realizaciones, una o más moléculas de la divulgación se administran a un mamífero, preferentemente, un ser humano, de manera concurrente con uno o más de otros agentes terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer. La expresión "de manera concurrente" no se limita a la administración de los agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino más bien se entiende que una molécula de la divulgación y el otro agente se administran a un mamífero en un orden y dentro de un intervalo temporal de modo que la molécula de la divulgación pueda actuar junto con el otro agente para proporcionar un mayor beneficio en comparación si estos fueron administrados de otro modo. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica) puede administrarse al mismo tiempo o de manera sucesiva en cualquier orden en diferentes puntos temporales; sin embargo, si no se administran al mismo

tiempo, estos deben administrarse de manera suficientemente próxima en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico puede administrarse por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía apropiada. En diversas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con menos de 1 hora de diferencia, aproximadamente 1 hora de diferencia, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia o no más de 48 horas de diferencia. En las realizaciones preferidas, se administran dos o más componentes durante la misma visita del paciente.

En otras realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con aproximadamente de 2 a 4 días de diferencia, con de aproximadamente 4 a 6 días de diferencia, con aproximadamente 1 semana de diferencia, con aproximadamente de 1 a 2 semanas de diferencia o más de 2 semanas de diferencia. En las realizaciones preferidas, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran en un marco temporal en el que ambos agentes todavía sean activos. Un experto en la materia podría determinar dicho marco temporal determinando la semivida de los agentes administrados.

En determinadas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos descritos en el presente documento se administran cíclicamente a un sujeto. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente durante un período de tiempo, seguido de la administración de un segundo agente y/o un tercer agente durante un período de tiempo y repitiendo esta administración secuencial. La terapia cíclica puede reducir la presentación de resistencia a una o más de las terapias, evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias y/o mejorar la eficacia del tratamiento.

En determinadas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran en un ciclo de menos de aproximadamente 3 semanas, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez cada 10 días o aproximadamente una vez cada semana. Un ciclo puede comprender la administración de un agente terapéutico o profiláctico por infusión durante aproximadamente 90 minutos cada ciclo, aproximadamente 1 hora cada ciclo, aproximadamente 45 minutos cada ciclo. Cada ciclo puede comprender al menos 1 semana de descanso, al menos 2 semanas de descanso, al menos 3 semanas de descanso. El número de ciclos administrados será de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 ciclos, más normalmente, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 ciclos y más normalmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 ciclos.

En otras realizaciones más, los agentes terapéuticos y profilácticos descritos en el presente documento se administran en regímenes de dosificación metronómica, por infusión continua o administración frecuente sin períodos de descanso prolongados. Dicha administración metronómica puede implicar la dosificación en intervalos constantes sin períodos de descanso. Por lo general, los agentes terapéuticos, en particular, los agentes citotócicos, se usan a menores dosis. Dichas pautas posológicas comprenden la administración diaria prolongada de dosis relativamente bajas durante períodos de tiempo largos. En las realizaciones preferidas, el uso de dosis menores puede reducir al mínimo los efectos secundarios tóxicos y eliminar los períodos de descanso. En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos y profilácticos se administran por infusión a dosis baja prolongada o continua que varía de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 2 días, a aproximadamente 1 semana, a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 1 mes y a aproximadamente 2 meses, a aproximadamente 3 meses, a aproximadamente 4 meses, a aproximadamente 5 meses, a aproximadamente 6 meses. El programa de dichas pautas posológicas puede ser optimizado por el oncólogo experto.

En otras realizaciones, los ciclos de tratamiento se administran de manera concurrente a un mamífero, es decir, se administran dosis individuales de los agentes terapéuticos por separado, pero en un intervalo temporal de modo que las moléculas de la divulgación puedan funcionar conjuntamente con el otro agente o agentes. Por ejemplo, un componente puede administrarse una vez a la semana en combinación con los demás componentes, que pueden administrarse una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En otras palabras, las pautas posológicas para los agentes terapéuticos se llevan a cabo de manera concurrente, aunque los agentes terapéuticos no se administren al mismo tiempo ni durante la misma visita del paciente.

Cuando se usan en combinación con otros agentes profilácticos y/o terapéuticos, las moléculas de la divulgación y el agente profiláctico y/o terapéutico pueden actuar de manera aditiva o, más preferentemente, de manera sinérgica. Puede administrarse una molécula de la divulgación de manera concurrente con uno o más agentes terapéuticos en la misma composición farmacéutica. Puede administrarse una molécula de la divulgación de manera concurrente con uno o más otros agentes terapéuticos en composiciones farmacéuticas diferentes. Puede administrarse una molécula de la divulgación antes de o después de la administración de otro agente profiláctico o terapéutico. También se describe la administración de una molécula de la divulgación en combinación con otros agentes

profilácticos o terapéuticos por las mismas o diferentes vías de administración, por ejemplo, oral y parenteral. Cuando una molécula de la divulgación se administra de manera concurrente con otro agente profiláctico o terapéutico que pueda producir efectos secundarios adversos incluyendo, pero sin limitación, toxicidad, el agente profiláctico o terapéutico puede administrarse ventajosamente a una dosis que se encuentre por debajo del umbral que genera el efecto secundario adverso.

Las cantidades de dosificación y las frecuencias de la administración que se proporcionan en el presente documento están englobadas por las expresiones terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. Además, la dosificación y frecuencia normalmente variarán de acuerdo con factores específicos de cada paciente, dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos que se administren, la gravedad y el tipo de cáncer, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta y el historial médico anterior del paciente. Los regímenes apropiados puede seleccionarlos un experto en la materia considerando dichos factores y siguiendo, por ejemplo, las dosis publicadas en la bibliografía y recomendadas en "Physician's Desk Reference" (56ª ed., 2002).

5.7.1 AGENTES ANTINEOPLÁSICOS

También se describe la administración de una o más moléculas de la divulgación con uno o más agentes terapéuticos utilizados para el tratamiento y/o prevención del cáncer. En una realización, pueden administrarse inhibidores de la angiogénesis combinados con las moléculas de la divulgación. Los inhibidores de la angiogénesis que se pueden usar en los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, entre otros: angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina antiangiogénica III; Angiozima; ABT-627; Bay 12-9566; Benefin; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado de cartílago (CDI); CAI; fragmento de complemento CD59; CEP-7055; Col 3; combretastatina A-4; Endostatina (fragmento de colágeno XVIII); fragmento de fibronectina; Gro-beta; Halofuginona; heparinasas; fragmento hexasacárido de heparina; HMV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por interferón (IP-10); interleucina-12; Kringle 5 (fragmento de plasminógeno); Marimastat; inhibidores de la metaloproteinasa (TIMP); 2-metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); Anticuerpo monoclonal IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; inhibidor de la ribonucleasa placentaria; inhibidor activador del plasminógeno; factor de plaquetas-4 (PF4); Prinomastat; fragmento de 16 kDa de prolactina; proteína relacionada con la proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; Retinoides; Solimastat; Escualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; Tetrahidrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; Trombospondina-1 (TSP-1); TNP-470; factor de crecimiento transformante-beta (TGF-b); Vasculostatina; Vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de la farnesil transferasa (FTI); y bisfosfonatos.

Los agentes antineoplásicos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la divulgación en las diversas realizaciones, Incluyendo composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas y kits, incluyen, pero sin limitación: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorrubicina; clorhidrato de doxorrubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracil; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleucina II (incluyendo la interleucina II recombinante o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-nl; interferón alfa-n3; interferón beta-1a; interferón gamma-1b; iproplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprólido; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; piposulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazina; puromicina; clorhidrato de puromicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalán sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorrelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorubicina. Otros fármacos antineoplásicos incluyen, pero sin limitación: 20-epi-1,25-dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol;

adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética anti-dorsalizante 1; antiandrógeno; carcinoma de próstata; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores de genes de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados de beta-lactama; beta-aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inhibidores de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; sulfoximina de butionina; calcipotriol; calfostina C; derivados de camptotecina; IL-2 de la viruela aviar; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboximidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína cinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetrorelix; clorinas; sulfonamida de cloroquinoxalina; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemnina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diazicuona; didemnina B; didox; dietilnorespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil-espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebseleno; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; episterida; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texapirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; herregulina; hexametilen-bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina; agonistas del interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptolstatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa leucocítico; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido de disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasa de matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario defectuoso; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; mitotoxina de factor de crecimiento de fibroblastos-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal; gonadotrofina coriónica humana; monofosforil lípido A + sk de pared celular de miobacteria; mopidamol; inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en el supresor 1 de tumores múltiples; agente anticanceroso de mostaza; micaperóxido B; extracto de la pared celular de micobacteria; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante de nitróxido; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetron; ondansetron; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosano sódico; pentostatina; pentrozol; perflubrón; perfosfamida; alcohol perilílico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanil; clorhidrato de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; propil-bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmunitario basado en la proteína A; inhibidor de la proteína cinasa C; inhibidores de la proteína cinasa C, microalgal; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno-hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de farnesil proteína transferasa ras; inhibidores de ras; inhibidores de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohitukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión al antígeno de cadena sencilla; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico; solverol; proteína de unión a la somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongistatina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiamida; inhibidores de estromelisina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramin; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinán; hormona estimulante tiroidea; etiopurpurina de etilo y de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre pluripotenciales; inhibidores de la transducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetrón; turosterida; inhibidores de tirosina cinasa; tirfostinas; Inhibidores de

UBC; ubenimex; factor inhibidor de crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vapreotida; variolina B; sistema de vector, terapia génica eritrocítica; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinixaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimalámero de zinostatina. Los fármacos antineoplásicos adicionales preferidos son 5-fluorouracilo y leucovorina.

Los ejemplos de los anticuerpos terapéuticos que se pueden usar en los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un inmunosupresor, anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado para la prevención del rechazo de aloinjerto renal agudo; PANOREX™ que es un anticuerpo IgG2a de antígeno de superficie celular murino anti-17-IA (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo IgG murino anti-idiotipo (epítopo GD3) (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo de integrina anti-αVβ3 humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Smart M195 que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); ICM3 es un anticuerpo humanizado anti-ICAM3 (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); IDEC-131 es un anticuerpo humanizado anti-CD40L (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es una IgG anti-CD3 humanizada (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo anti-factor del complemento 5 (C5) humanizado (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo humanizado anti-TNF-α (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab anti-TNF-a humanizado (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 anti-TNF-α humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo humanizado anti-α4β7 (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); y CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF-β_2 humano (Cambridge Ab Tech). Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse se presentan en la tabla 8.

Tabla 8: Anticuerpos terapéuticos contra el cáncer

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
Abgenix	ABX-EGF	Cáncer	receptor del EGF
AltaRex	OvaRex	cáncer de ovario	antígeno tumoral CA125
	BravaRex	cánceres metastásicos	antígeno tumoral MUC1
Antisoma	Theragyn (pemtumomab-itrio-90)	cáncer de ovario	antígeno PEM
	Therex	cáncer de mama	antígeno PEM
Boehringer	Blvatuzumab	cabeza y cuello	CD44
Ingelheim		cáncer	
Centocor/J&J	Panorex	Cáncer colorrectal	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	MI agudo	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	apoplejía isquémica	gp IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHL	CD20
CRC Technology	Anticuerpo monoclonal, 105AD7 idiotípico	vacuna contra el cáncer colorrectal	gp72
Crucell	Anti-EpCAM	cáncer	Ep-CAM
Cytoclonal	Anticuerpo monoclonal, cáncer de pulmón	cáncer de pulmón no microcítico	NA
Genentech	Herceptin	cáncer mama metastásico	HER-2
	Herceptin	cáncer de mama en fase temprana	HER-2
	Rituxan	NHL de grado bajo o folicular recidivante/resistente al tratamiento	CD20
	Rituxan	NHL de grado intermedio o alto	CD20
	Anticuerpo monoclonal-VEGF	CPNMC, metastásico	VEGF
	Anticuerpo monoclonal-VEGF	cáncer colorrectal, metastásico	VEGF

(continuación)

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
	Fab de AMD	degeneración macular asociada a la edad	CD18
	E-26 (IgE de 2.ª gen)	Asma y rinitis alérgica	IgE
IDEC	Zevalin (Rituxan + itrio-90)	NHL de linfocitos B positivos a CD20, recidivante o resistente de bajo grado o folicular y NHL resistente a rituximab	CD20
ImClone	Cetuximab + innotecán	refractario colorrectal carcinoma	receptor del EGF
	Cetuximab + cisplatino y radiación	de cabeza y cuello recién diagnosticado o recurrente cáncer	receptor del EGF
	Cetuximab + gemcitabina	recién diagnosticado metastásico pancreático carcinoma	receptor del EGF
	Cetuximab + cisplatino + 5FU o Taxol	cáncer de cabeza y cuello recurrente o metastásico	receptor del EGF
	Cetuximab + carboplatino + paclitaxel	carcinoma de pulmón no microcítico recién diagnosticado	receptor del EGF
	Cetuximab + cisplatino	cáncer de cabeza y cuello (enfermedad local-regional incurable, extensa y metástasis distante)	receptor del EGF
	Cetuximab + radiación	carcinoma de cabeza y cuello local, avanzado	receptor del EGF
	BEC2 + Bacillus Calmette Guerin	carcinoma de pulmón microcítico	mimético ganglióside GD3
	BEC2 + Bacillus Calmette Guerin	melanoma	mimético ganglióside GD3
	IMC-1C11	cáncer colorrectal con metástasis en hígado	receptor del VEGF
ImmonoGen	nuC242-DM1	Colorrectal cáncer gástrico y pancreático	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	linfoma no de Hodgkin	CD22
	LymphoCide Y-90	linfoma no de Hodgkin	CD22
	CEA-Cide	tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Cide Y-90	tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer colorrectal (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer de mama (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer de pulmón (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	tumores intraoperatorios (obtención de radioimágenes)	CEA
	LeukoScan (sulesomab marcado con Tc-99m)	Infección de tejidos blandos (radioimagen).	CEA
	LymphoScan (marcado con Tc-99m)	linfomas (radioimagen)	CD22
	AFP-Scan (marcado con Tc-99m)	Cánceres de células gémicas del hígado 7 (radioimagen)	AFP
Intracel	HumaRAD-HN (+ itrio-90)	cáncer de cabeza y cuello	NA
	HumaSPECT	obtención de imágenes colorrectales	NA
Medarex	MDX-101 (CTLA-4)	cáncer de próstata y otros cánceres	CTLA-4

(continuación)

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
	MDX-210 (sobreexpresión de her-2)	Cáncer de próstata	HER-2
	MDX-210/MAK	Cáncer	HER-2
MedImmune	Vitaxin	Cáncer	$\alpha v\beta_3$
Merck KGaA	Anticuerpo monoclonal 425	Diversos cánceres	receptor del EGF
	IS-IL-2	Diversos cánceres	Ep-CAM
Millennium	Campath (alemtuzumab)	leucemia linfocítica crónica	CD52
NeoRx	CD20-estreptavidina (+ biotinitio 90)	linfoma no de Hodgkin	CD20
	Avidicina (albúmina + NRLU13)	cáncer metastásico	NA
Peregrine	Oncolym (+ yodo-131)	linfoma no de Hodgkin	HLA-DR 10 beta
	Cotara (+ yodo-131)	glioma maligno irresecable	proteínas asociadas al ADN
Pharmacia Corporation	C215 (+ enterotoxina estafilocócica)	cáncer de páncreas	NA
	Anticuerpo monoclonal, Cáncer de pulmón/riñón	Cáncer de pulmón y riñón	NA
	nacolomab tafenatox (C242 + enterotoxina estafilocócica)	cáncer de colon y de páncreas	NA
Protein Design	Nuvion	Tumores malignos de linfocitos T	CD3
Labs	SMART M195	LMA	CD33
	SMART1D10	NHL	antígeno HLA-DR
Titan	CEAVac	cáncer colorrectal, avanzado	CEA
	TriGem	melanoma metastásico y cáncer de pulmón microcítico	GD2-gangliósido,
	TriAb	cáncer mama metastásico	MUC-1
Trilex	CEAVac	cáncer colorrectal, avanzado	CEA
	TriGem	melanoma metastásico y cáncer de pulmón microcítico cáncer	GD2-gangliósido,
	TriAb	cáncer mama metastásico	MUC-1
Viventia	NovoMAb-G2	No Hodgkins	NA
Biotech	radiomarcado	linfoma	
	Monopharm C	Carcinoma colorrectal y de páncreas	antígeno SK-1
	GlioMAb-H (+ toxina gelonina)	glioma, melanoma y neuroblastoma	NA
Xoma	Rituxan	NHL de grado bajo o folicular recidivante/resistente al tratamiento	CD20
	Rituxan	NHL de grado intermedio o alto	CD20
	ING-1	adenocarcinoma	Ep-CAM

5.7.2 INMUNOMODULADORES Y AGENTES ANTIINFLAMATORIOS

También se describen métodos de tratamiento para enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias que comprenden la administración de las moléculas de la divulgación en combinación con otros agentes de tratamiento. Los ejemplos de los agentes inmunomoduladores incluyen, pero sin limitación, metotrexato, ENBREL, REMICADE™, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A y antibióticos macrólidos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticoesteroides, esteroides, micofenolato de mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloamindas (por ejemplo, leflunamida), moduladores de los receptores de linfocitos T y moduladores de los receptores de citocinas.

Los agentes antiinflamatorios han presentado resultados satisfactorios en tratamientos de trastornos inflamatorios y autoinmunes y ahora son un tratamiento común y convencional de dichos trastornos. Cualquier agente antiinflamatorio bien conocido por un experto en la técnica puede usarse en los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, beta-agonistas, agentes anticolinérgicos y xantinas metílicas. Los ejemplos de AINE incluyen, pero sin limitación, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenac (VOLTAREN™), etodolac (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralac (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindac (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Dichos AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de medicamentos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero sin limitación, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina y eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

Un ejemplo no limitante de los anticuerpos que pueden usarse para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios junto con las moléculas de la divulgación se presenta en la tabla 9 y un ejemplo no limitante de los anticuerpos que pueden usarse para el tratamiento o la prevención de trastornos autoinmunitarios se presenta en la tabla 10.

Tabla 9: Anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias

Nombre del anticuerpo	Antígeno diana	Tipo de producto	Isotipo	Espónsores	Indicación
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Artritis reumatoide
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Nefritis
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Derivación cardiopulmonar
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Infarto de miocardio
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastia
ABX-CBL	CBL	Humano		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	Murino	IgG	Abgenix Inc	Rechazo a aloinjertos
ABX-IL8	IL-8	Humano	IgG2	Abgenix Inc	Psoriasis
Antegren	VLA-4	Humanizado	IgG	Athena/Elan	Esclerosis múltiple
Anti-CD11a	CD11a	Humanizado	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Psoriasis
Anti-CD18	CD18	Humanizado	Fab'2	Genentech Inc	Infarto de miocardio
Anti-LFA1	CD18	Murino	Fab'2	Pasteur-Merieux/Immunotech	Rechazo a aloinjertos
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	Rechazo a aloinjertos
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	SLE
BTI-322	CD2	Rata	IgG	Medimmune Inc	GvHD, Psoriasis
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Crohn
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Artritis reumatoide
CDP850	E-selectina	Humanizado		Celltech	Psoriasis
Corsevin M	Fact VII	Quimérico		Centocor	Anticoagulante
D2E7	TNF-alfa	Humano		CAT/BASF	Artritis reumatoide

(continuación)

Nombre del anticuerpo	Antígeno diana	Tipo de producto	Isotipo	Espónsores	Indicación
Hu23F2G	CD 11/18	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Esclerosis múltiple
Hu23F2G	CD 11/18	Humanizado	IgG	ICOS Pharm Inc	Apoplejía
IC14	CD14			ICOS Pharm Inc	Choque tóxico
ICM3	ICAM-3	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Psoriasis
IDEC-114	CD80	Primatizado		IDEC Pharm/Mitsubishi	Psoriasis
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	SLE
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	Esclerosis múltiple
IDEC-151	CD4	Primatizado	IgG1	IDEC Pharm/Glaxo SmithKline	Artritis reumatoide
IDEC-152	CD23	Primatizado		IDEC Pharm	Asma/alergia
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Artritis reumatoide
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Crohn
LDP-01	beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Apoplejía
LDP-01	beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Rechazo a aloinjertos
LDP-02	alpha4beta7	Humanizado		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Colitis ulcerosa
MAK-195F	TNF alfa	Murino	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	Choque tóxico
MDX-33	CD64 (FcR)	Humano		Medarex/Centeon	Trastornos hematológicos autoinmunes
MDX-CD4	CD4	Humano	IgG	Medarex/Eisai/Genmab	Artritis reumatoide
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	Psoriasis
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Rechazo a aloinjertos
OrthoClone OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Enfermedad autoinmune
Orthoclone/anti-CD3 OKT3	CD3	Murino	mIgG2a	Ortho Biotech	Rechazo a aloinjertos
RepPro/Abcixima b	gpIIbIIIa	Quimérico	Fab	Centocor/lilly	Complicaciones de angioplastia coronaria
rhuMab-E25	IgE	Humanizado	IgG1	Genentech/Novartis/Tanox Biosystems	Asma/alergia
SB-240563	IL5	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/alergia
SB-240683	IL-4	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/alergia
SCH55700	IL-5	Humanizado		Celltech/Schering	Asma/alergia
Simulect	CD25	Quimérico	IgG1	Novartis Pharm	Rechazo a aloinjertos

(continuación)

Nombre del anticuerpo	Antígeno diana	Tipo de producto	Isotipo	Espónsores	Indicación
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Enfermedad autoinmune
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Rechazo a aloinjertos
SMART a-CD3	CD3	Humanizado	IgG	Protein Design Lab	Psoriasis
Zenapax	CD25	Humanizado	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman-La Roche	Rechazo a aloinjertos

Tabla 10: Anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de trastornos autoinmunes

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
ABX-RB2		anticuerpo contra el antígeno CBL en linfocitos T, linfocitos B y células NK son anticuerpos completamente humanos del Xenomouse
5c8 (un antígeno anticuerpo anti-CD40)	Los ensayos de fase II fueron interrumpidos en octubre del 99, examínense los "efectos adversos"	CD-40
IDEC 131	lupus eritematoso sistémico (LES)	anti CD40 humanizado
IDEC 151	artritis reumatoide	primatizado; anti-CD4
IDEC 152	Asma	primatizado; anti-CD23
IDEC 114	Psoriasis	anti-CD80 primatizado
MEDI-507	artritis reumatoide; esclerosis múltiple enfermedad de Crohn psoriasis	anti-CD2
LDP-02 (mAb anti-B7)	enfermedad intestinal inflamatoria enfermedad de Crohn colitis ulcerosa	receptor de integrina a4b7 en glóbulos blancos (leucocitos)
anticuerpos SMART anti-interferón gamma	trastornos autoinmunes	Anti-interferón gamma
Verteportin	artritis reumatoide	
MDX-33	trastornos sanguíneos causados por reacciones autoinmunes idiopáticas Trombocitopenia purpurea (ITP) anemia hemolítica autoinmune	anticuerpo monoclonal contra receptores de FcRI
MDX-CD4	tratar artritis reumatoide y otra autoinmunidad	anticuerpo monoclonal contra la molécula receptora de CD4
VX-497	trastornos autoinmunitarios esclerosis múltiple artritis reumatoide enfermedad intestinal inflamatoria lupus psoriasis	inhibidor de inosina monofosfato deshidrogenasa (la enzima necesaria para preparar nuevo ARN y ADN que se usa en la producción de nucleótidos necesarios para la proliferación de linfocitos)
VX-740	artritis reumatoide	inhibidor de ICE interleucina-1 beta (la enzima conversora controla las vías que conducen a una respuesta inmunitaria agresiva)
VX-745	específico de la inflamación implicada en la señalización química del inicio de la respuesta inmunitaria y la progresión de la inflamación	inhibidor de P38MAP cinasa, proteína cinasa activada por mitógeno

(continuación)

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
Enbrel (etanercept)		se dirige a TNF (factor de necrosis tumoral)
IL-8		anticuerpo monoclonal completamente humano contra IL-8 (interleucina 8)
Apogen MP4		El antígeno recombinante destruye de forma selectiva los linfocitos T asociadas con la enfermedad induce la apoptosis Los linfocitos T eliminados mediante muerte celular programada ya no atacan a las células propias del cuerpo. Los apógenos específicos se dirigen a los linfocitos T específicos

5.7.3 AGENTES QUE SE USAN PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Las moléculas de la divulgación se pueden administrar en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos adicionales conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa. También se describe el uso de las moléculas de la divulgación en combinación con antibióticos conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa. Los antibióticos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la divulgación incluyen, pero sin limitación, macrólido (por ejemplo, tobramicina (Tobi®)), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina (Keflex®), cefradina (Velosef®), cefuroxima (Ceftin®), cefprozilo (Cefzil®), cefaclor (Ceclor®), cefixima (Suprax®) o cefadroxil (Duricef®)), una claritromicina (por ejemplo, claritromicina (Biaxin®)), una eritromicina (por ejemplo, eritromicina (EMycin®)), una penicilina (por ejemplo, penicilina V (V-Cillin K® o Pen Vee K®)) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacino (Floxin®), ciprofloxacino (Cipro®) o norfloxacino (Noroxin®)), antibióticos aminoglicósidos (por ejemplo, apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, neomicina, neomicina, undecilenato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina y espectinomicina), antibióticos de anfenicol (por ejemplo, azidamfenicol, cloranfenicol, florfenicol y tiamfenicol), antibióticos de ansamicina (por ejemplo, rifamida y rifampina), carbacefems (por ejemplo, loracarbef), carbapenems (por ejemplo, biapenem e imipenem), cefalosporinas (por ejemplo, cefaclor, cefadroxilo, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, cefozoprano, cefpimizol, cefpiramida y cefpiroma), cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazona, cefmetazol y cefminox), monobactamas (por ejemplo, aztreonam, carumonam y tigemonam), oxacefems (por ejemplo, flomoxef y moxalactama), penicilinas (por ejemplo, amdinocilina, amdinocilina pivoxilo, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina sódica, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamcilina, yodhidrato de penetamato, penicilina o-benetamina, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepiciclina y fencihicilina potásica), lincosamidas (por ejemplo, clindamicina y lincomicina), anfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidina, enviomicina, tetraciclinas (por ejemplo, apiciclina, clortetraciclina, clomociclina y demeclociclina), 2,4-diaminopirimidinas (por ejemplo, brodimoprima), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona y cloruro de furazolio), quinolonas y análogos de estas (por ejemplo, cinoxacina, clinafloxacino, flumequina y grepagloxacina), sulfonamidas (por ejemplo, acetil-sulfametoxipirazina, bencilsulfamida, noprilsulfamida, ftalilsulfacetamida, sulfacrisoidina y sulfacitina), sulfonas (por ejemplo, diatimosulfona, glucosulfona sódica y solasulfona), cicloserina, mupirocina y tuberina.

Las moléculas de la divulgación pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antimicóticos. Los agentes antimicóticos que se pueden usar combinados con las moléculas de la divulgación incluyen, pero sin limitación anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, fluconazol, intratecal, flucitosina, miconazol, butoconazol, clotrimazol, nistatina, terconazol, tioconazol, ciclopirox, econazol, haloprogrina, naftifina, terbinafina, undecilenato y griseofuldina.

Las moléculas de la divulgación pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antivíricos. Los agentes antivíricos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la divulgación incluyen, pero sin limitación, inhibidores de proteasa, inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores no nucleosídicos de transcriptasa inversa y análogos de nucleósido. Los ejemplos de los agentes antivíricos incluyen, pero sin limitación, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina, así como foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, los interferones alfa; adefovir, clevadina, entecavir, pleconaril.

5.8 TERAPIA CON VACUNA

También se describe el uso de una composición de la divulgación para inducir una respuesta inmunitaria contra un agente antigénico o inmunogénico, incluyendo, pero sin limitación, antígenos del cáncer y antígenos de enfermedades infecciosas (cuyos ejemplos se desvelan a continuación). Las composiciones de vacuna descritas en el presente documento pueden comprender uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos frente a los que se

desea una respuesta inmunitaria, en donde los uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos están recubiertos con un anticuerpo variante descrito en el presente documento que tiene una afinidad potenciada hacia FcγRIIIA. Las composiciones de vacuna descritas en el presente documento son particularmente eficaces para generar una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta inmunitaria protectora frente al agente antigénico o inmunogénico.

En algunas realizaciones, el agente antigénico o inmunogénico en las composiciones de vacuna descritas en el presente documento comprende un virus contra el que se desea una respuesta inmunitaria. Los virus pueden ser recombinantes o quiméricos y preferentemente están atenuados. La producción de los virus recombinantes, quiméricos y atenuados puede realizarse usando los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. También se describe una vacuna viral recombinante viva o una vacuna viral recombinante inactivada para formularse como se describe en el presente documento. Se puede preferir la vacuna de virus vivo, porque la multiplicación en el hospedador conduce a un estímulo prolongado de clase y magnitud similares al que se produce en las infecciones naturales, y por tanto, confiere una considerable inmunidad de larga duración. La producción de dichas formulaciones de vacuna de virus recombinantes, vivos puede lograrse usando métodos convencionales que implican la propagación del virus en cultivo celular o en el alantoides del embrión de pollo seguido por purificación.

En una realización específica, el virus recombinante es no patógeno para el sujeto al que se le administra. En este sentido, el uso de virus modificados por ingeniería genética con fines vacunales puede requerir la presencia de características de atenuación en estas cepas. La introducción de mutaciones apropiadas (por ejemplo, eliminaciones) en los moldes usados para la transfección pueden proporcionar a los nuevos virus las características de atenuación. Por ejemplo, las mutaciones con cambio de sentido específicas que se asocian con sensibilidad a la temperatura o adaptación al frío pueden prepararse en mutaciones por eliminación. Estas mutaciones deben ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas con mutantes sensibles al frío o a la temperatura y las frecuencias de inversión deben ser extremadamente bajas. Las tecnologías de ADN recombinante para ingeniería de virus recombinantes son conocidas en la técnica y pueden usarse. Por ejemplo, se conocen técnicas para modificar virus de ARN de hebra negativa, véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos n.º 5.166.057.

Como alternativa, se pueden construir virus quiméricos con características "suicidas" para usarlos en las formulaciones de vacuna intradérmicas descritas en el presente documento. Dichos virus solo pasarían por una o unas cuantas series de replicación dentro del hospedador. Si se usara como vacuna, el virus recombinante pasaría ciclo/s de replicación limitado/s e induciría un nivel de respuesta inmunitaria suficiente, pero no pasaría más en el hospedador humano ni provocaría una enfermedad. Como alternativa, puede formularse el virus inactivado (muerto). Las formulaciones de vacunas de virus inactivados se pueden preparar usando las técnicas convencionales para "destruir" los virus quiméricos. Las vacunas de virus inactivados están "muertas" en el sentido de que se ha destruido su infectividad. En el mejor de los casos, la infectividad del virus se destruye sin afectar a su inmunogenicidad. Con el fin de preparar vacunas inactivadas, el virus quimérico puede hacerse crecer en cultivo celular o en el alantoides de embriones de pollo, se puede purificar mediante ultracentrifugación zonal, se inactiva con formaldehído o β-propiolactona y se combina.

En determinadas realizaciones, epítopos completamente foráneos, incluyendo los antígenos derivados de otros patógenos víricos o no víricos se pueden modificar por ingeniería en el virus para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmica descritas en el presente documento. Por ejemplo, antígenos de virus no relacionados, como el VIH (gp160, gp120, gp41) antígenos de parásitos (por ejemplo, malaria), antígenos bacterianos o micóticos o antígenos tumorales pueden modificarse por ingeniería, obteniéndose la cepa atenuada.

Se puede construir prácticamente cualquier secuencia génica heteróloga en los virus quiméricos descritos en el presente documento para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmicas. Preferentemente, las secuencias génicas heterólogas son restos y péptidos que actúan como modificadores de la respuesta biológica. Preferentemente, los epítopos que inducen una respuesta inmunitaria protectora frente a cualquiera de una variedad de patógenos, o los antígenos que se unen a anticuerpos neutralizantes, pueden ser expresados por o como parte de los virus quiméricos. Por ejemplo, las secuencias génicas heterólogas que pueden construirse en virus quiméricos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, hemaglutinina neuraminidasa gripal y paragripal, y glicoproteínas de fusión tales como los genes de HN y F de PIV3 humano. En otra realización más, las secuencias génicas heterólogas que pueden modificarse por ingeniería en los virus quiméricos pueden ser aquellas que codifican proteínas con actividades inmunomoduladoras. Los ejemplos de las proteínas inmunomoduladoras incluyen, pero sin limitación, citocinas, interferón de tipo 1, interferón gamma, factores estimulantes de colonias, interleucina 1, -2, -4, -5, -6, -12, y antagonistas de estos agentes.

También se describen células patógenas o virus, preferentemente virus atenuados, que expresan el anticuerpo variante en su superficie.

Las composiciones de vacuna descritas en el presente documento pueden comprender un polipéptido de fusión en donde un agente antigénico o inmunogénico está unido operativamente a un anticuerpo variante descrito en el presente documento que tiene una afinidad mejorada por FcγRIIIA. La modificación por ingeniería de los polipéptidos

de fusión para su uso en las composiciones de vacuna se realiza usando los métodos de tecnología de ADN recombinante habituales y están dentro del nivel de conocimientos habituales.

También se describen métodos para inducir tolerancia en un sujeto administrando una composición descrita en el presente documento. Preferentemente, una composición adecuada para inducir tolerancia en un sujeto comprende un agente antigénico o inmunogénico recubierto con un anticuerpo variante descrito en el presente documento, en donde el anticuerpo variante tiene una mayor afinidad por FcγRIIB. Aunque no se pretende quedar limitado a ningún mecanismo de acción en particular, dichas composiciones son eficaces para inducir tolerancia activando la vía inhibidora mediada por FcγRIIB.

5.9 COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

También se describen métodos y composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas descritas en el presente documento (es decir, diacuerpos) que comprenden múltiples dominios de unión a epítopo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo). También se describen métodos de tratamiento, profilaxis y mejoría de uno o más síntomas asociados a 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 divulgación, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o una molécula conjugada de la divulgación. En un aspecto preferido, un anticuerpo, una proteína de fusión o una molécula conjugada, está esencialmente purificada (es decir, esencialmente libre de sustancias que limiten su efecto o produzcan efectos secundarios no deseados). En una realización específica, el sujeto es un animal, preferentemente, un mamífero tal como un animal no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y un primate (por ejemplo, mono, tal como un macaco cangrejero y un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. En otra realización preferida más, el anticuerpo de la divulgación es de la misma especie que el sujeto.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar una composición que comprende las moléculas de la divulgación, 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. Los métodos para administrar una molécula de la divulgación incluyen, pero sin limitación, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, las vías intranasal y oral). En una realización específica, las moléculas de la divulgación se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y 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. Véase, por ejemplo, las Patentes de los 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 PCT n.º WO 92/19244; documento WO 97/32572; documento WO 97/44013; documento WO 98/31346; y el documento WO 99/66903.

Las moléculas de la divulgación se pueden envasar en un envase cerrado herméticamente tal como una ampolla o un sobre que indique la cantidad del anticuerpo. Las moléculas de la divulgación se suministran en forma de polvo liofilizado esterilizado en seco o concentrado libre de agua en un envase cerrado herméticamente, y pueden reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración apropiada para la administración a un sujeto. Preferentemente, las moléculas de la divulgación se suministran en forma de un polvo liofilizado estéril, seco en un envase cerrado herméticamente a una dosis unitaria de al menos 5 mg, más preferentemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg o al menos 75 mg. Las moléculas liofilizadas de la divulgación deben almacenarse a una temperatura 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 realización alternativa, las moléculas de la divulgación se suministran en forma líquida en un envase cerrado herméticamente que indique la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferentemente, la forma líquida de las moléculas de la divulgación se suministra en un envase cerrado herméticamente con al menos 1 mg/ml, más preferentemente, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml de las moléculas.

La cantidad de la composición de la invención que será eficaz para 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 ensayo de modelos *in vitro* o animales.

Para los diacuerpos englobados por la divulgación, la dosis administrada a un paciente normalmente es de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosis administrada a un paciente es de entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, de 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, de 0,0001 a 0,15 mg/kg, de 0,0001 a 0,10 mg/kg, de 0,001 a 0,5 mg/kg, de 0,01 a 0,25 mg/kg o de 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis y frecuencia de administración de los diacuerpos de la divulgación se pueden disminuir o modificar potenciando la captación y penetración de los diacuerpos en el tejido mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

En una realización, la dosis de las moléculas de la divulgación administradas a un paciente puede ser de 0,01 mg a 1.000 mg/día si se usa como terapia de un solo agente. En otra realización, las moléculas de la divulgación se usan combinadas con otras composiciones terapéuticas y las dosis administradas a un paciente son menores que cuando se usan dichas moléculas como terapia de un solo agente.

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas localmente en la zona que necesite tratamiento; esto se puede lograr mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, por inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferentemente, cuando se administra una molécula de la divulgación, debe prestarse atención en usar materiales a los que no se absorba la molécula.

En otra realización, las composiciones pueden administrarse 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, pág. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibíd., pág. 3 17-327; véase, en general, en el mismo lugar).

En otra realización más, las composiciones pueden administrarse en un sistema de liberación controlada o un sistema de liberación sostenida. Se puede usar cualquier técnica conocida por un experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprendan una o más moléculas de la divulgación. Véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos n.º 4.526.938; publicación PCT WO 91/05548; publicación PCT WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotheraphy 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 realización, se puede usar una bomba en un sistema de liberación controlada (véase 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 realización, se pueden usar materiales poliméricos para lograr la liberación controlada de anticuerpos (véase, 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 los Estados Unidos n.º 5.679.377; Patente de los Estados Unidos n.º 5.916.597; Patente de los Estados Unidos n.º 5.912.015; Patente de los Estados Unidos n.º 5.989.463; Patente de los Estados Unidos n.º 5.128.326; publicación PCT n.º WO 99/15154; y publicación PCT n.º WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros que se usan en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitación, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), metacrilato de poli(metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol de vinilo), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA) y poliortoésteres. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada próximo a la diana terapéutica (por ejemplo, los pulmones), requiriéndose, por tanto, solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pág. 115-138 (1984)). En otra realización, las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada se usan 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. En otra realización, se usa un sistema de administración sostenida no polimérico, con lo que, como sistema de administración 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 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 divulgación. Véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos n.º 4.526.938; publicaciones internacionales PCT n.º WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotheraphy 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 es un ácido nucleico que codifica un diacuerpo de la divulgación, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para potenciar la expresión de su diacuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retrovírico (véase la patente de los Estados Unidos 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, por ejemplo, Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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 moléculas de la divulgación puede incluir un solo tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, se trata un sujeto con moléculas de la divulgación en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana durante entre aproximadamente 1 y 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. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran una vez al día, dos veces o tres veces al día. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosis eficaz de las moléculas usadas para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el ciclo del tratamiento específico.

5.9.1 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Las composiciones descritas en el presente documento 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. Dichas composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico desvelado en el presente documento o una combinación de estos agentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, las composiciones descritas en el presente documento comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de diacuerpo de la divulgación y un anticuerpo terapéutico (por ejemplo, anticuerpo monoclonal específico para tumor) que es específico para un antígeno de cáncer particular y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que se ha aprobado por parte de un organismo de control del gobierno federal o estatal, o que está listada en la Farmacopea de Estados Unidos o en otra farmacopea reconocida de forma general 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 vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales 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. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

En general, los ingredientes de las composiciones descritas en el presente documento 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 principio activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede distribuirse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración.

Estas composiciones descritas en el presente documento pueden formularse en sus formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, aquellas 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-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

5.9.2 TERAPIA GÉNICA

Los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican moléculas de la divulgación pueden administrarse para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, el trastorno o la infección, por medio de terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o que puede expresarse. En esta realización, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o proteína de fusión que media en un efecto terapéutico o profiláctico.

Se puede usar cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica. A continuación, se describen métodos ilustrativos.

Para realizar revisiones generales de los métodos para terapia génica, véase Goldspiel et al. (1993) "Human Gene Therapy", Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu et al. (1991) "Delivery Systems For Gene Therapy", Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev (1993) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions", Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) "The Basic Science Of Gene Therapy", Science 260:926-932; y Morgan et al. (1993) "Human Gene Therapy", Ann. Rev. Biochem 62:191 -217. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel et al. (eds.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990).

Una composición descrita en el presente documento puede comprender ácidos nucleicos que codifican un diacuerpo de la divulgación, formando parte dichos ácidos nucleicos de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un hospedador apropiado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente, promotores heterólogos, operativamente unidos a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico del tejido. En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de anticuerpos y cualquier otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que fomentan la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller et al. (1989) "Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra et al. (1989) "Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2-Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells", Nature 342:435-438).

Una composición descrita en el presente documento puede comprender ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión, formando parte dichos ácidos nucleicos de un vector de expresión que expresa la proteína de fusión en un hospedador apropiado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente, promotores heterólogos, operativamente unidos a la región codificante de una proteína de fusión, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico del tejido. En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que la secuencia codificante de la proteína de fusión y cualquier otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que fomentan la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de la proteína de fusión.

La administración de los ácidos nucleicos en el sujeto puede ser directa, en cuyo caso el sujeto es expuesto directamente al ácido nucleico o a vectores portadores del ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso, las células primero son transformadas con los ácidos nucleicos *in vitro*, después se trasplantan al sujeto. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En una realización específica, Las secuencias de ácido nucleico se administran directamente *in vivo*, cuando estas se expresan para producir el producto codificado. Esto se puede realizar mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolos como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolos de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante infección, usando vectores retrovíricos defectuosos o atenuados u otros vectores víricos (véase la patente de los Estados Unidos n.º

4.980.286), o por inyección directa de ADN desnudo, 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, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolos en unión a un péptido conocido por entrar en el núcleo, administrándolo en unión a un antígeno sometido a 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) (que puede usarse para elegir tipos de células que expresen específicamente los receptores), etc. En otra realización, Pueden formarse complejos de ácido nucleico-antígeno en los que el antígeno comprenda un péptido vírico fusogénico para romper endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En otra realización más, el ácido nucleico puede ser la diana *in vivo* para la captación y expresión específica de células, seleccionando como diana un receptor específico (véanse, por ejemplo, publicaciones PCT WO 92/06180; documento WO 92/22635; documento WO92/20316; documento WO93/14188; documento WO 93/20221). Como alternativa, se puede introducir un ácido nucleico intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula hospedadora para su expresión, mediante recombinación homóloga. (Koller et al. (1989) "Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra et al. (1989) "Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2-Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells", Nature 342:435-438).

Pueden usarse vectores víricos que contengan secuencias de ácido nucleico que codifiquen una molécula de la divulgación (por ejemplo, un diacuerpo o una proteína de fusión). Por ejemplo, se puede usar un vector retrovírico (Véase Miller et al. (1993) "Use Of Retroviral Vectors For Gene Transfer And Expression", Meth. Enzymol. 217:581-599). Estos vectores retrovíricos contienen los componentes necesarios para el empaquetamiento correcto del genoma vírico y la integración en el ADN de la célula hospedadora. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo o una proteína de fusión que va a usarse en terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita el suministro de la secuencia de nucleótidos a un sujeto. Se pueden encontrar más detalles acerca de los vectores retrovíricos en Boesen et al. (1993) "Circumvention Of Chemotherapy-Induced Myelosuppression By Transfer Of The Mdr1 Gene", Biotherapy 6:291-302), que describen el uso de un vector retrovírico para suministrar el gen mdr 1 a células madre hematopoyéticas con el fin de hacer a las células madre más resistentes a quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovíricos en terapia génica son: Clowes et al. (1994) "Long-Term Biological Response Of Injured Rat Carotid Artery Seeded With Smooth Muscle Cells Expressing Retrovirally Introduced Human Genes", J. Clin. Invest. 93:644-651; Keim et al. (1994) "Retrovirus-Mediated Gene Transduction Into Canine Peripheral Blood Repopulating Cells", Blood 83:1467-1473; Salmons et al. (1993) "Targeting Of Retroviral Vectors For Gene Therapy", Human Gene Therapy 4:129-141; y Grossman et al. (1993) "Retroviruses: Delivery Vehicle To The Liver", Curr. Opin. Genetics and Devel. 3:110-114.

Los adenovirus son otros vectores víricos que pueden usarse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para suministrar genes a los epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan de manera natural los epitelios respiratorios en los que provocan una enfermedad leve. Otras dianas para los sistemas de suministro a base de adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no estén en división. Kozarsky et al. (1993, "Gene Therapy: Adenovirus Vectors", Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503) presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout et al. (1994, "Lung Gene Therapy: *In Vivo* Adenovirus-Mediated Gene Transfer To Rhesus Monkey Airway Epithelium", Human Gene Therapy. 5:3-10) demostraron el uso de vectores adenovíricos para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Otros casos de uso de adenovirus en terapia génica se pueden encontrar en Rosenfeld et al. (1991) "Adenovirus-Mediated Transfer Of A Recombinant Alpha 1-Antitrypsin Gene To The Lung Epithelium *In Vivo*", Science 252:431-434; Rosenfeld et al. (1992) "*In Vivo* Transfer Of The Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene To The Airway Epithelium", Cell 68:143-155; Mastrangeli et al. (1993) "Diversity Of Airway Epithelial Cell Targets For *In Vivo* Recombinant Adenovirus-Mediated Gene Transfer", J. Clin. Invest. 91:225-234; Publicación PCT WO94/12649; y Wang et al. (1995) "A Packaging Cell Line For Propagation Of Recombinant Adenovirus Vectors Containing Two Lethal Gene-Region Deletions", Gene Therapy 2:775-783. En una realización preferida, se usan vectores adenovíricos.

También se han propuesto virus adenoasociados (AAV) para usarlos en terapia génica (véase, por ejemplo, Walsh et al. (1993) "Gene Therapy For Human Hemoglobinopathies", Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 y la patente de EE.UU. n.º 5.436.146).

Otro enfoque para la terapia génica implica transferir un gen a las células de un cultivo tisular mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección vírica. Normalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células luego se siembran bajo selección para aislar aquellas células que hayan captado y estén expresando el gen transferido. Estas células después se suministran a un sujeto.

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector vírico o bacteriófago, que contenga las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por

cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. En este campo, se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes foráneos en las células (véase, por ejemplo, Loeffler et al. (1993) "Gene Transfer Into Primary And Established Mammalian Cell Lines With Lipopolyamine-Coated DNA", Meth. Enzymol. 217:599-618, Cotten et al. (1993) "Receptor-Mediated Transport Of DNA Into Eukaryotic Cells", Meth. Enzymol. 217: 618-644) y se puede usar, con la condición de que no se alteren las funciones necesarias para el desarrollo y fisiológicas de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico pueda ser expresado por la célula y preferentemente pueda ser heredado y expresado por su progenie de células.

Las células recombinantes resultantes pueden suministrarse a un sujeto mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, las células madre o progenitoras hematopoyéticas) preferentemente pueden administrarse por vía intravenosa. La cantidad de células previstas para su uso depende del efecto deseado, del estado del paciente, etc. y puede ser determinada por un experto en la materia.

Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico para fines de terapia génica abarcan tipo de célula disponible deseado e incluyen pero sin limitación, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, los fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular, células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, obtenidas a partir de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En una realización preferida, la célula usada para la terapia génica puede ser autóloga para el sujeto.

En una realización en la que se usan células recombinantes en terapia génica, las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión se introducen en las células de modo que éstas puedan ser expresadas por las células o su progenie, y las células recombinantes entonces pueden administrarse *in vivo* para un efecto terapéutico. En una realización específica, se usan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que pueda ser aislada y mantenida *in vitro* puede usarse potencialmente (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/08598; Stemple et al. (1992) "Isolation Of A Stem Cell For Neurons And Glia From The Mammalian Neural Crest", Cell 7 1:973-985; Rheinwald (1980) "Serial Cultivation Of Normal Human Epidermal Keratinocytes", Meth. *Cell Bio.* 21A:229-254; y Pittelkow et al. (1986) "New Techniques For The *In Vitro* Culture Of Human Skin Keratinocytes And Perspectives On Their Use For Grafting Of Patients With Extensive Burns", Mayo Clinic Proc. 61:771-777).

En una realización específica, el ácido nucleico que va a introducirse con los fines de la terapia génica puede comprender un promotor inducible operativamente unido a la región codificante, de modo que pueda controlarse la expresión del ácido nucleico controlando la presencia o ausencia del inductor de la transcripción apropiado.

5.9.3 KITS

También se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases llenados con las moléculas de la divulgación. Adicionalmente, también se puede incluir uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad también 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 descritas en el presente documento. Opcionalmente asociado con dicho recipiente o recipientes puede ser un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de agentes farmacéuticos o productos biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana.

También se describen kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende una o más moléculas de la divulgación. En otra realización, un kit comprende además uno o más agentes profilácticos o terapéuticos diferentes útiles para el tratamiento del cáncer, en una o más recipientes. En otra realización, un kit comprende además uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más antígenos del cáncer asociados con el cáncer. En determinadas realizaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones, el agente profiláctico o terapéutico puede ser un agente terapéutico biológico u hormonal.

5.10 CARACTERIZACIÓN Y DEMOSTRACIÓN DE LA UTILIDAD TERAPÉUTICA

Varios aspectos de las composiciones farmacéuticas, los agentes profilácticos o terapéuticos descritos en el presente documento, preferentemente se pueden ensayar *in vitro*, en un sistema de cultivo celular, y en un organismo de modelo animal, tal como un sistema de modelo animal de roedor, para determinar la actividad terapéutica deseada antes de usarlos en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos que pueden usarse para determinar si la administración de una composición farmacéutica específica es la deseada incluyen ensayos en cultivos celulares en los que se cultiva una muestra de tejido del paciente, y se expone a o se pone en contacto de otro modo con una composición farmacéutica descrita en el presente documento, y se observa el efecto de dicha

composición en la muestra de tejido. La muestra de tejido puede obtenerse por biopsia del paciente. Esta prueba permite realizar la identificación de la/s molécula/s profiláctica/s o terapéutica/s más eficaces para cada paciente. En diversas realizaciones específicas, se pueden llevar a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de los tipos de células implicados en un trastorno autoinmunitario o inflamatorio (por ejemplo, linfocitos T), para determinar si una composición farmacéutica descrita en el presente documento tiene un efecto deseado en dichos tipos de células.

Pueden ensayarse combinaciones de los agentes profilácticos y/o terapéuticos en sistemas de modelos animales apropiados antes de su uso en seres humanos. Dicho sistema de modelos animales incluyen, pero sin limitación, ratas, ratones, pollo, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Se puede usar cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. Pueden ensayarse combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en un sistema de modelo de ratón. Dichos sistemas modelo se usan ampliamente y son bien conocidos por el experto. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden administrarse en dosis repetidas. Algunos aspectos del procedimiento pueden variar. Dichos aspectos pueden ser el régimen temporal de administración de los agentes profilácticos y/o terapéuticos y si dichos agentes pueden administrarse por separado o como una mezcla.

Los modelos animales preferidos que se usan en los métodos descritos en el presente documento son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresen los FcγR humanos en células efectoras de ratón, por ejemplo, puede usarse cualquier modelo de ratón descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.877.396. Los ratones transgénicos para uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, ratones portadores de FcγRIIIA humano; ratones portadores de FcγRIIA humano; ratones portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIIA humano. ratones portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIA humano. Preferentemente, las mutaciones que muestren los niveles más altos de actividad en los ensayos funcionales descritos anteriormente se ensayarán para usarlas en estudios de modelos animales antes de su uso en seres humanos. Pueden prepararse cantidades suficientes de anticuerpos para usarlos en modelos animales usando los métodos descritos anteriormente, por ejemplo, usando sistemas de expresión de mamífero y métodos de purificación desvelados e ilustrados en el presente documento.

Pueden usarse modelos de xenoinjerto de ratón para examinar la eficacia de los anticuerpos de ratón generados contra una diana específica del tumor, basándose en la afinidad y especificidad de los dominios de unión a epítopo de las moléculas de diacuerpo de la divulgación y en la capacidad del diacuerpo para generar una respuesta inmunitaria (Wu et al. (2001) "Mouse Models For Multistep Tumorigenesis", Trends Cell Biol. 11: S2-9). Los ratones transgénicos que expresan los FcγR humanos en células efectoras de ratón son únicos y son modelos animales diseñados para ensayar la eficacia de las interacciones de Fc-FcγR humanos. Se pueden usar pares de estirpes de ratones transgénicos FcγRIIIA, FcγRIIIB y FcγRIIA generados en el laboratorio del Dr. Jeffrey Ravetch (mediante un acuerdo de licencia con Rockefeller U. y Sloan Kettering Cancer center) tales como los enumerados en la siguiente tabla 11.

Tabla 11: Cepas de ratones

Antecedentes de la cepa	FcR humano
Atímico / CD16A KO	Ninguno
Atímico / CD16A KO	FcγRIIIA
Atímico / CD16A KO	FcγR IIA
Atímico / CD16A KO	FcγR IIA y IIIA
Atímico / CD32B KO	Ninguno
Atímico / CD32B KO	FcγR IIB

La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas se puede determinar usando diversos modelos animales experimentales de artritis reumatoide conocidos en la técnica descritos en Crofford L. J. y Wilder R. L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty et al.(eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). También se pueden usar modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunes para evaluar la actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación de la invención. Los siguientes son algunos ensayos proporcionados como ejemplos, y no como limitación.

Los principales modelos animales para la artritis o enfermedad inflamatoria conocidos en la técnica y ampliamente usados incluyen: modelos de rata con artritis inducida por adyuvantes, modelos de rata y ratón de artritis inducida por colágeno y modelos de rata, conejo y hámster de artritis inducida por antígeno, todos descritos en Crofford L. J. y Wilder R. L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty et al.(eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993).

La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas puede evaluarse usando un modelo de rata de artritis inducida por carragenanos. La artritis inducida por carragenanos también se ha usado en conejo, perro y cerdo en

estudios de artritis o inflamación crónicas. Para determinar la eficacia terapéutica se usa la evaluación histomorfométrica cuantitativa. Los métodos para usar dicho modelo de artritis inducida por carragenanos se describen en Hansra P. et al. (2000) "Carrageenan-induced Arthritis In The Rat", Inflamación, 24(2): 141-155. También se usan comúnmente modelos animales de inflamación inducida por zimosano como se sabe y se describe en la técnica.

La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas también se puede evaluar midiendo la inhibición del edema de la pata inducido por carragenanos en la rata, usando una modificación del método descrito en Winter C. A. et al. (1962) "Carrageenan-Induced Edema In Hind Paw Of The Rat As An Assay For Anti-Inflammatory Drugs" Proc. Soc. Exp. Biol Med. 111, 544-547. Este ensayo se ha usado como examen *in vivo* primario para la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los AINE, y se considera predictivo de la eficacia en seres humanos. La actividad antiinflamatoria de los agentes profilácticos o terapéuticos que se va a ensayar se expresa como el porcentaje de inhibición del aumento del peso de la pata trasera del grupo que se va a ensayar con respecto al grupo de control dosificado con vehículo.

Adicionalmente, se pueden usar modelos animales para la enfermedad inflamatoria del intestino para evaluar la eficacia de las terapias combinadas (Kim et al. (1992) "Experimental Colitis In Animal Models", Scand. J. Gastroentrol. 27:529-537; Strober (1985) "Animal Models Of Inflammatory Bowel Disease--An Overview", Dig. Dis. Sci. 30(12 Supl):3S-10S). La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son enfermedades inflamatorias del intestino humanas que se pueden inducir en animales. Los polisacáridos sulfatados, incluyendo, pero sin limitación, amilopectina, carragenina, sulfato de amilopectina y sulfato de dextrano o irritantes químicos, incluyendo, pero sin limitación, ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) y ácido acético pueden administrarse a animales por vía oral para inducir enfermedades inflamatorias del intestino.

También se pueden usar modelos animales para trastornos autoinmunes para evaluar la eficacia de las terapias combinadas. Se han desarrollado modelos animales para trastornos autoinmunes tales como diabetes de tipo 1, autoinmunidad de la tiroides, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (Flanders et al. (1999) "Prevention Of Type 1 Diabetes From Laboratory To Public Health", Autoimmunity 29:235-246; Rasmussen et al. (1999) "Models To Study The Pathogenesis Of Thyroid Autoimmunity", Biochimie 81:511-515; Foster (1999) "Relevance Of Systemic Lupus Erythematosus Nephritis Animal Models To Human Disease", Semin. Nephrol. 19:12-24).

Además, se puede usar cualquiera de los ensayos conocidos por los expertos en la materia para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinadas desveladas en el presente documento para enfermedades autoimunes y/o inflamatorias.

La toxicidad y eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos descritos en el presente documento se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción LD_{50}/ED_{50}. Se prefieren agentes profilácticos y/o terapéuticos que presenten altos índices terapéuticos. Aunque es posible usar agentes profilácticos y/o terapéuticos que presenten efectos secundarios tóxicos, ha de tenerse cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija dichos agentes al sitio de tejido afectado para minimizar el daño potencial a células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y de estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos agentes se encuentra preferentemente dentro del intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier agente utilizado en el método descrito en el presente documento, puede estimarse inicialmente la dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración circulante en plasma que incluye la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

La actividad antineoplásica de las terapias usadas también se puede determinar usando diversos modelos animales experimentales para el estudio del cáncer, tal como puede ser el modelo de ratón SCID o ratón transgénico o ratón atímico con xenoinjertos humanos, modelos animales, tales como hámsteres, conejos, conocidos en la técnica y descritos en "Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development" (1999, eds. Fiebig y Burger); "Contributions to Oncology" (1999, Karger); "The Nude Mouse in Oncology Research" (1991, eds. Boven y Winograd); y "Anticancer Drug Development Guide" (1997 ed. Teicher).

Los modelos animales preferidos para determinar la eficacia terapéutica de las moléculas de la divulgación son modelos de xenoinjerto de ratón. Las estirpes celulares tumorales que pueden usarse como fuente de tumores para

el xenoinjerto incluyen, pero sin limitación, células SKBR3 y MCF7, que pueden derivarse de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen receptores de erbB2 y prolactina. Las células SKBR3 se han usado habitualmente en la técnica como modelos tumorales de ADCC y xenoinjerto. Como alternativa, se pueden usar células OVCAR3 derivadas de adenocarcinoma de ovario humano como fuente para tumores de xenoinjerto.

Los protocolos y las composiciones de la divulgación preferentemente se ensayan *in vitro* y luego *in vivo*, para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de usarlos en seres humanos. Los agentes y los métodos terapéuticos se pueden explorar usando células de una estirpe celular tumoral o maligna. Se pueden usar muchos ensayos convencionales en la técnica para evaluar tal supervivencia y/o el crecimiento; por ejemplo, la proliferación de células se puede ensayar midiendo la incorporación de ^{3}H-timidina, mediante el recuento directo de células, detectando los cambios en la actividad de transcripción de genes conocidos tales como los protooncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular se puede evaluar mediante tinción con azul tripano, la diferenciación se puede evaluar visualmente basándose en los cambios en la morfología, la disminución del crecimiento y/o la formación de colonias en agar blando o la formación de redes tubulares en membrana basal tridimensional o la preparación de la matriz extracelular, etc.

Los compuestos para su uso en terapia se pueden ensayar en sistemas de modelos animales apropiados antes de ensayarlos en seres humanos, incluyendo, pero sin limitación, ratas, ratones, pollo, vacas, monos, conejos, hámsteres, *etc.,* por ejemplo, los modelos animales anteriormente descritos. Los compuestos pueden usarse luego en ensayos clínicos apropiados.

Además, puede usarse cualquiera de los ensayos conocidos por los expertos en la materia para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinadas desveladas en el presente documento para el tratamiento o la prevención del cáncer, trastorno inflamatorio o enfermedad autoinmune.

6. Ejemplos

6.1 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES

Se construyeron un diacuerpo covalente monoespecífico y un diacuerpo covalente biespecífico para evaluar las características de producción recombinante, purificación y unión de cada uno. Las moléculas de diacuerpo purificadas por afinidad que se produjeron mediante los sistemas de expresión recombinante descritos en el presente documento se encontraron mediante análisis de SDS-PAGE y SEC que consistían en especies diméricas simples. Los análisis de ELISA y SPR revelaron además que el diacuerpo biespecífico covalente presentaba afinidad por ambos antígenos diana y que podía unirse a ambos antígenos simultáneamente.

Materiales y métodos:

Construcción y diseño de moléculas polipeptídicas: se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir cuatro construcciones polipeptídicos, representadas esquemáticamente en la FIG. 2. Construcción 1 (SEQ ID NO: 9) compuesta del dominio VL del anticuerpo 2B6 humanizado, que reconoce FcγRIIB, y el dominio VH del anticuerpo 3G8 humanizado, que reconoce a FcγRIIIA. Construcción 2 (SEQ ID NO: 11) compuesta por el dominio VL del anticuerpo Hu3G8 y el dominio VH de Hu2B6. Construcción 3 (SEQ ID NO: 12) compuesta por el dominio VL del anticuerpo Hu3G8 y el dominio VH de Hu3G8. Construcción 4 (SEQ ID NO: 13) compuesta por el dominio VL del anticuerpo Hu2B6 y el dominio VH de Hu2B6.

PCR y construcción del vector de expresión: Las secuencias codificantes de los dominios VL y VH se amplificaron a partir del ADN molde usando cebadores directos e inversos diseñados para que los productos iniciales de PCR contuvieran secuencias solapantes, permitiendo que la PCR solapante generara las secuencias codificantes de las construcciones polipeptídicas deseadas.

Amplificación inicial por PCR del ADN molde: Aproximadamente 35 ng del ADN molde, por ejemplo, la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo de interés; 1 ul de cebadores directos e inversos 10 uM; 2,5 ul de tampón 10x pfuUltra (Stratagene, Inc.); 1 ul de dNTP 10 mM; 1 ul de 2,5 unidades/ul de ADN polimerasa pfuUltra (Stratagene, Inc.); y agua destilada hasta un volumen total de 25 ul se mezclaron suavemente en un tubo de microcentrifugación, y se centrifugaron brevemente en una microcentrifugadora para recogerse la mezcla de reacción en el fondo del tubo. Se realizaron las reacciones de PCR usando el sistema de PCR GeneAmp 9700 (PE Applied Biosystem) y los siguientes parámetros: 94 °C, 2 minutos; 25 ciclos de 94 ºC, cada 15 segundos; 58 °C, 30 segundos; y 72 °C, 1 minuto.

El dominio VL del anticuerpo Hu2B6 se amplificó a partir de la cadena ligera del anticuerpo Hu2B6 usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56, respectivamente. El dominio VH del anticuerpo Hu2B6 se amplificó a partir de cadena pesada del anticuerpo Hu2B6 usando cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, respectivamente. El dominio VL del anticuerpo Hu3G8 se amplificó a partir de la cadena ligera del anticuerpo Hu3G8 usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 59, respectivamente. El

dominio VH del anticuerpo Hu3G8 se amplificó a partir de cadena pesada del anticuerpo Hu3G8 usando cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61, respectivamente.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 % durante 30 minutos a 120 voltios. Los productos de PCR se cortaron del gel y se purificaron usando el kit de extracción MinElute GEI (Qiagen, Inc.).

PCR solapante: Se combinaron los productos iniciales de la PCR como se describe más adelante y se amplificaron usando las mismas condiciones de PCR descritas para la amplificación del ADN molde. Los productos de la PCR solapante también se purificaron como se ha descrito anteriormente.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 1, SEQ ID NO: 9 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 2) se amplificó combinando los productos de la PCR de las amplificaciones del dominio VL de Hu2B6 y el dominio VH de Hu3G8, y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:61, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 2, SEQ ID NO: 11 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 2) se amplificó combinando los productos de la PCR de las amplificaciones del dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu2B6, y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:58, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 3, SEQ ID NO: 12 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 2) se amplificó combinando los productos de la PCR de las amplificaciones del dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu3G8, y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:61, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 4, SEQ ID NO: 13 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 2) se amplificó combinando los productos de la PCR de las amplificaciones del dominio VL de Hu2B6 y el dominio VH de Hu2B6, y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:58, respectivamente.

Los cebadores directos de los dominios VL (es decir, SEQ ID NO: 55) y cebadores inversos de los dominios VH (es decir, La SEQ ID NO: 58 y la SEQ ID NO: 61) contenían sitios de restricción únicos para permitir la clonación del producto final en un vector de expresión. Los productos de la PCR superpuestos purificados se digirieron con las endonucleasas de restricción Nhe I y EcoR I, y se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pCIneo (Promega, Inc.). Los plásmidos que codifican las construcciones se designaron como se identificaron en la Tabla 12:

Tabla 12. CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDO

Construcción codificante	Designación del plásmido	Inserción
1	pMGX0669	hu2B6VL-hu3G8VH
2	pMGX0667	hu3G8VL-hu2B6VH
3	pMGX0666	hu3G8VL-hu3G8VH
4	pMGX0668	hu2B6VL-hu2B6VH

Expresión de polipeptidil-diacuerpo: pMGX0669, que codifica la construcción 1, se cotransfectó con pMGX0667, que codifica la construcción 2, en células HEK-293 usando Lipofectamine 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La cotransfección de estos dos plásmidos fue diseñada para dirigir la expresión de un diacuerpo biespecífico covalente (CBD) inmunoespecífico para FcγRIIB y FcγRIIIA (el diacuerpo h2B6-h3G8). pMGX0666 y pMGX0668, que codifican las construcciones 3 y 4, respectivamente, se cotransfectaron por separado en células HEK-293 para la expresión de un diacuerpo monoespecífico covalente (CMD), inmunoespecífico para FcγRIIIA (el diacuerpo h3G8) y FcγRIIB (el diacuerpo h2B6), respectivamente. Tras tres días en cultivo, se purificaron los productos secretados del medio condicionado.

Purificación: Los diacuerpos fueron capturados del medio condicionado usando los antígenos pertinentes acoplados a Sepharose 4B activada con CNBr. La resina de Sepharose de afinidad se equilibró en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 antes de cargarla. Tras la carga, se lavó la resina con tampón de equilibrado antes de la elución. Se eluyeron los diacuerpos de la resina lavada usando glicina 50 mM pH 3,0. Los diacuerpos eluidos fueron inmediatamente neutralizados con Tris/HCl 1 M pH 8,0 y se concentraron usando un concentrador del tipo de centrifugación. Los diacuerpos concentrados se purificaron además mediante cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex 200 equilibrada en PBS.

SEC: Se usó la cromatografía de exclusión molecular para analizar el tamaño aproximado y la heterogeneidad de los diacuerpos eluidos de la columna. El análisis de SEC se realizó en una columna Superdex 200HR 10/30 de GE Healthcare equilibrada con PBS. Para la comparación, se usaron como controles los perfiles de elución de una IgG de longitud completa (-150 kDa), un fragmento Fab (-50 kDa) y un Fv monocatenario (-30 kDa)).

ELISA: La unión de los diacuerpos eluidos y purificados se caracterizó mediante el ensayo ELISA, como se describe en 5.4.2. Se usaron 50 ul/pocillo de una solución 2 ug/ml de sCD32B-Ig para recubrir una placa de 96 pocillos Maxisorp en tampón de carbonato a 4 °C durante la noche. Se lavó la placa tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1 %) y se bloqueó con BSA al 0,5 % en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, Se

diluyeron CBD h2B6-h3G8, CMD h2B6 o CMD h3G8 en el tampón de bloqueo en una serie de diluciones de factor de dilución de dos para generar un intervalo de concentraciones de diacuerpos, De 0,5 µg/ml a 0,001 µg/ml. A continuación, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS-T tres veces, se añadieron 50 ul/pocillo de sCD16A-biotina a 0,2 ug/ml a cada pocillo. Se volvió a incubar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS-T tres veces, se usaron para la detección 50 ul/pocillo de una dilución 1:5.000 de estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech). Se dejó incubar el conjugado de HRP-estreptavidina durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló usando 80 ul/pocillo del sustrato TMB. Tras una incubación de 10 minutos, se detuvo la reacción DE HRP-TMB añadiendo 40 ul/pocillo de H_2SO_4 al 1 %. La DO450 nm se leyó utilizando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax, y los resultados se representaron utilizando el software GraphPadPrism 3.03.

Ensayo BIAcore: Los parámetros cinéticos de la unión de los diacuerpos eluidos y purificados se analizaron usando un ensayo BIAcore (BIAcore Instrument 1000, BIAcore Inc., Piscataway, N. J.) y el software asociado como se describe en el apartado 5.4.3.

Se inmovilizaron sCD16A, sCD32B o sCD32A (control negativo) en una de las cuatro celdas de flujo (la célula de flujo 2) de una superficie de una microplaca de sensor mediante química de acoplamiento de aminas (mediante la modificación de los grupos carboximetilo con mezcla de NHS/EDC) de modo que, en la superficie, se inmovilizaron aproximadamente 1.000 unidades de respuesta (UR) de cualquier receptor. Después de esto, se “desprotegieron” los ésteres activos que no reaccionaron con una inyección de Et-NH2 1M. Una vez preparada una superficie apropiada, se hicieron pasar diacuerpos biespecíficos covalentes (CBD h2B6-h3G8) o los diacuerpos monoespecíficos covalentes (CMD h2B6 o CMB h3G8) sobre la superficie mediante inyecciones de 180 segundos de una solución 6,25-200 nM a un caudal de 70 ml/min. A modo comparativo, también se ensayó el sFv de h3G8.

Una vez recogido todo el conjunto de datos, se ajustaron las curvas de unión resultantes de manera global usando algoritmos de cálculo suministrados por el fabricante, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan las constantes K_{on} and K_{off}, a partir de las que se deduce la constante de unión en equilibrio aparente, K_D se deduce como el cociente de las dos constantes de velocidad (es decir, K_{off}/K_{on}). Se pueden encontrar tratamientos más detallados de cómo se derivan cada una de las constantes de velocidad en el manual del software BIAevaluation (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Las fases de asociación y disociación se ajustaron por separado. La constante de velocidad de disociación se obtuvo para el intervalo de 32-34 s de la fase de disociación de 180 s; el ajuste de la fase de asociación se obtuvo mediante un modelo de Langmuir 1:1 y se escogió el ajuste de base de acuerdo con los criterios $R_{máx}$ y chi^2 para los diacuerpos biespecíficos y el scFv; para la unión del CMD, se usó un ajuste de analito bivalente.

Resultados

El análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras reveló que el producto purificado de los sistemas de expresión de CMD h3G8, CMD h2B6 y CBD h2B6-h3G8 fue una sola especie con un peso molecular estimado de aproximadamente 50 kDa (FIG. 3, carriles 4, 5 y 6, respectivamente). En condiciones reductoras, el producto purificado de cualquiera de los sistemas de expresión de CMD se desplazó como una sola banda (carriles 1 y 2), mientras que el producto purificado a partir del sistema de CBD h2B6-h3G8 fue revelado como 2 proteínas diferentes (FIG. 3, carril 3). Todos los polipéptidos purificados a partir del sistema de expresión y visualizados mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras migraron a aproximadamente 28 kDa.

El análisis SEC de cada uno de los productos del sistema de expresión también reveló una única especie molecular (Figura 4B), cada una de las cuales se eluyó al mismo tiempo aproximado que un fragmento Fab de IgG (~50 kDa) (Figura 4A). Los resultados indican que el producto purificado por afinidad fue un dímero covalente homogéneo para el caso del sistema de expresión de CMD y un heterodímero covalente homogéneo para el caso de CBD h2B6-h3G8.

Se usó un ensayo ELISA de tipo sándwich para ensayar la unión de CBD h2B6-h3G8 para determinar la especificidad hacia cualquiera o ambas moléculas CD32B y/o CD16A (FIG. 5). CD32B sirvió como antígeno diana y se usó CD16A como sonda secundaria. La señal positiva del ensayo ELISA reveló que el CBD h2B6-h3G8 heterodimérico tenía especificidad hacia ambos antígenos. Ensayos similares del CMD h3G8 (que no se unió a CD32B) no mostraron señal alguna.

El análisis de SPR indicó que el CMD h3G8 reconoció de manera inmunoespecífica sCD16, pero no sCD32B, que el CMD h2B6 reconoció de manera inmunoespecífica sCD32B, pero no sCD16, y que el CBD h2B6-h3G8 reconoció de manera inmunoespecífica ambas moléculas sCD16 y sCD32B (FIG. 6A-B). Ninguno de los diacuerpos ensayados se unió al receptor de control, sCD32A (FIG. 6C).

El análisis de SPR también se usó para estimar las constantes cinéticas y de equilibrio de los CMD y del CBD h2B6-h3G8 hacia sCD16 y/o sCD32B. Los resultados se compararon con las mismas constantes calculadas para un fragmento scFV de h3G8. Las FIG. 7A-E muestran los resultados gráficos del análisis de SPR. Las velocidades

cinéticas de asociación y disociación, así como la constante de equilibrio, calculadas a partir de los resultados que se representan en la FIG. 7 se proporcionan en la Tabla 13.

Tabla 13. Constantes cinéticas y de equilibrio calculadas a partir de los datos BIAcore.

Receptor/Analito	k-on	k-off	Kd
Diacuerpo sCD16 / h3G8	2,3 x10^5	0,004	18,0
CBD sCD16 / h2B6-h3G8	4,6 x 10^5	0,010	22,7
scFv sCD16/h3G8	3,2 x 10^5	0,013	38,7
CBD sCD32B / h2B6-h3G8	3,6 x 10^5	0,005	15,0
Diacuerpo sCD32B / h2B6	6,2 x 10^5	0,013	21,0

De acuerdo con los resultados de los análisis de ELISA, los estudios confirman que el heterodímero covalente h2B6-h3G8 conservó la especificidad hacia CD32B y CD16, y fue capaz de unirse a ambos antígenos simultáneamente. La molécula se representa esquemáticamente en la FIG. 8.

6.2 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES QUE COMPRENDEN DOMINIOS Fc

En un esfuerzo por crear una molécula de tipo IgG, es decir, que comprende un dominio Fc, se modificó uno de los polipéptidos que comprenden la molécula CBD heterodimérica presentada en el Ejemplo 6.1 para que comprendiera además un dominio Fc (creando una cadena 'más pesada' y una 'más ligera', análogas a una cadena pesada y ligera de un anticuerpo). La molécula biespecífica heterodimérica entonces contendría un dominio Fc que se dimerizaría con una molécula homóloga, formando una molécula de tipo IgG tetramérica con tetravalencia (es decir, formada por dimerización a través de los dominios Fc de las moléculas biespecíficas heterodiméricas). De forma interesante, dichas moléculas tetraméricas no se detectaron en los medios condicionados de los sistemas de expresión recombinante usando los ensayos funcionales, por ejemplo, analizando los medios condicionados para la unión inmunoespecífica a los antígenos diana. En su lugar, solo una molécula dimérica, que comprende monómeros que consisten en un dominio VL, VH y Fc, se detectó en dichos ensayos funcionales. Para ensayar si la estabilidad de la estructura tetramérica teórica era el problema, los polipéptidos que comprendían el dominio Fc fueron modificados por ingeniería para que comprendieran además una región bisagra, mientras que los polipéptidos que comprendían la cadena 'más ligera' fueron modificados por ingeniería para que comprendieran además los 6 aminoácidos C-terminales del dominio constante de cadena ligera kappa humana. Cuando se coexpresaron cadenas "más pesadas" y "más ligeras" rediseñadas en los sistemas de expresión recombinantes, los ensayos funcionales detectaron moléculas de diacuerpo que eran capaces de unirse de manera inmunoespecífica a los antígenos diana y los anticuerpos anti-Fc.

Materiales y métodos

Construcción y diseño de moléculas polipeptídicas: Se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir versiones modificadas de las construcciones 1 y 2 que se presentan en el Ejemplo 6.1. La construcción 5 (SEQ ID NO: 14) y 6 (SEQ ID NO: 15), se crearon modificando por ingeniería las construcciones 1 y 2, respectivamente, para que comprendieran además un dominio Fc. La construcción 7 (SEQ ID NO: 16) se creó modificando por ingeniería la construcción 1 para que comprendiese adicionalmente la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23) en su extremo C-terminal. La construcción 8 (SEQ ID NO: 18) se creó modificando por ingeniería la construcción 2 para que comprendiera además una región bisagra y un dominio Fc (que comprendía la mutación V215A). La representación esquemática de las construcciones 5-8 se encuentra en la FIG. 9.

PCR y construcción del vector de expresión: Todos los protocolos de PCR y de purificación de los productos de PCR fueron como se describe en el Ejemplo 6.1 Los plásmidos pMGX0669 y pMGX0667 sirvieron como moldes para las secuencias codificantes de las construcciones 1 y 2, respectivamente. Las secuencias codificantes para el dominio Fc y/o el dominio bisagra de HuIgG fueron SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5, respectivamente. Las secuencias codificantes de los ADN molde se amplificaron usando cebadores directos e inversos para que los productos de PCR tuvieran secuencias solapantes, permitiendo a la PCR solapante generar las secuencias codificantes de los productos deseados.

La secuencia codificante de la construcción 1 se amplificó a partir de pMGX0669 usando cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 62, respectivamente. La secuencia codificante de la construcción 2 se amplificó a partir de pMGX0667 usando cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 63, respectivamente. El bisagra-Fc de HuIgG se amplificó usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66, respectivamente. La construcción 7 (SEQ ID NO: 16) se amplificó a partir de pMGX0669 usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 67.

PCR solapante: Los productos iniciales de PCR se combinaron como se describe más adelante, y se amplificaron y se purificaron como se describe en el Ejemplo 6.1.
La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 5, SEQ ID NO: 14 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 9) se amplificó combinando los productos de la PCR de las amplificaciones de la construcción 1 y Fc de HuIgG y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:64, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 6, SEQ ID NO: 15 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 9) se amplificó combinando los productos de la PCR de las amplificaciones de la construcción 2 y Fc de HuIgG y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:66, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 8, SEQ ID NO: 18 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 9) se amplificó combinando los productos de la PCR de las amplificaciones de la construcción 2 y bisagra-Fc de HuIgG y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:66, respectivamente.

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) como se ha descrito anteriormente. Los plásmidos codificantes de las construcciones fueron diseñados como se identifica en la tabla 14:

Tabla 14. CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDO

Construcción codificante	Designación del plásmido	Inserción
5	pMGX0676	hu2B6VL-hu3G8VH-huFc
6	pMGX0674	hu3G8VL-hu2B6VH-huFc
7	pMGX0677	Hu2B6VL-hu3G8VH-FNRGEC
8	pMGX0678	Hu3G8VL-hu2B6VH-bisagra hu-Fc (A215V)

Expresión del polipéptido/diacuerpo: Cuatro cotransfecciones separadas en células HEK-293 usando Lipofectamine 2000, como se describe en la sección 6.1, fueron realizadas: pMGX0669 y pMGX0674, que codifican las construcciones 1 y 6, respectivamente; pMGX0667 y pMGX0676, que codifican las construcciones 2 y 5, respectivamente; y pMGX0677 y pMGX0678, que codifican las construcciones 7 y 8, respectivamente.

La cotransfección de estos dos plásmidos fue diseñada para conducir a la expresión de un diacuerpo biespecífico (CBD) de tetravalencia con estructura de tipo IgG, inmunoespecífico de FcγRIIB y FcγRIIIA. También se realizó una cotransfección adicional: pMGX0674 y pMGX0676, que codifican las construcciones 6 y 5, respectivamente. Tras tres días en cultivo, se recogió el medio condicionado. La cantidad de producto secretado en el medio condicionado fue cuantificada mediante análisis de ELISA anti-Fc de IgG usando el Fc purificado como patrón. A continuación, se normalizaron las concentraciones del producto en las muestras basándose en la cuantificación, y las muestras normalizadas se usaron para los ensayos restantes.

ELISA: Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo secretadas en el medio mediante ELISA de tipo sándwich como se ha descrito *anteriormente citado.* A menos que se indique de otro modo, se usó CD32B para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se usó CD16 conjugado con HRP como sonda.

Resultados

Se usó un ensayo ELISA para ensayar las muestras normalizadas de los sistemas de expresión recombinante que comprendían las construcciones 1 y 6 (pMGX669-pMGX674), las construcciones 2 y 5 (pMGX667-pNGX676) y las construcciones 5 y 6 (pMGX674-pMGX676) para la expresión de moléculas de diacuerpo con capacidad para la unión simultánea a CD32B y CD16A (FIG. 10). Los datos del ensayo ELISA indicaron que la cotransfección con las construcciones 1 y 6 y la cotransfección con las construcciones 2 y 5 no pudieron producir un producto que pudiera unirse a cualquiera o ambos antígenos (FIG. 10, □ y ▲, respectivamente). Sin embargo, la cotransfección de las construcciones 5 y 6 condujo a la secreción de un producto con capacidad de unión a ambos antígenos CD32B y CD16. El último producto fue un dímero de las construcciones 5 y 6, que contenía un sitio de unión para cada antígeno con una estructura como se representa esquemáticamente en la FIG. 11.

Con el fin de impulsar la formación de una estructura heterodimérica de tipo IgG, la secuencia codificante para seis aminoácidos adicionales se anexó al extremo C-terminal de la construcción 1, generando la construcción 7 (SEQ ID NO: 16 y mostrado esquemáticamente en la FIG. 9). Los seis aminoácidos adicionales, FNRGEC (SEQ ID NO: 23), fueron derivados del extremo C-terminal de la cadena ligera kappa e interactúan normalmente con el dominio bisagra superior de la cadena pesada en una molécula de IgG. A continuación, se modificó un dominio bisagra por ingeniería, obteniéndose la construcción 6, generando la construcción 8 (SEQ ID NO: 18 y FIG. 9). La construcción 8 además comprendía una mutación de aminoácidos en la región bisagra superior, A215V. Los plásmidos de

expresión codificantes de la construcción 7 y la construcción 8, pMGX677 y pMGX678, respectivamente, fueron luego cotransfectados en células HEK-293 y expresados como se describe.

Las moléculas de diacuerpo producidas a partir del sistema de expresión recombinante que comprendía las construcciones 7 y 8 (pMGX0677 + pMGX0678), se compararon en un ensayo ELISA para la unión a CD32B y CD16A a las moléculas de diacuerpo producidas a partir de los sistemas de expresión que comprendían las construcciones 1 y 6 (pMGX669 + pMGX674), las construcciones 2 y 8 (pMGX669 + pMGX678) y las construcciones 6 y 7 (pMGX677 + pMGX674) (FIG. 12).

Como antes, la molécula producida por el sistema de expresión que comprendía las construcciones 1 y 6 (pMGX669 + pMGX674) demostró incapacidad para unirse a CD32A y CD16A (FIG. 10 y FIG. 12). Por el contrario, el producto de la coexpresión de las construcciones 7 y 6 (pMGX0677 + pMGX0674) o de la coexpresión de las construcciones 7 y 8 (pMGX0677-pMGX0678) pudieron unirse a CD32B y CD16 (FIG. 12). Se debe señalar que la construcción 7 es análoga a la construcción 1, a excepción de que la construcción 7 contiene la secuencia C-terminal FNRGEC (SEQ ID NO: 23); y que la construcción 8 es análoga a la construcción 6, salvo que la construcción 8 comprende un dominio bisagra y la mutación A215V. Los datos indican que la adición de los 6 aminoácidos adicionales a partir del extremo C-terminal de cadena ligera C-kappa (FNRGEC; SEQ ID NO: 23) a la cadena "más ligera" que no porta Fc ayudó a estabilizar la formación de las moléculas de diacuerpo tetraméricas similares a IgG, independientemente de si la cadena más pesada correspondiente comprendía un dominio de bisagra (es decir,, pMGX0677 + pMGX0674 y pMGX0677-pMGX0678, FIG. 12). La adición del dominio de la bisagra al polipéptido "más pesado" que lleva Fc, sin la adición de la secuencia C-terminal de FNRGEC (SEQ ID NO: 23) a la cadena "más ligera" correspondiente, aparentemente no pudo efectuar una estabilización similar (es decir, falta de unión por producto de cotransfección de las construcciones 2 y 8 (pMGX669 + pMGX678)). La estructura de la molécula de diacuerpo tetramérico se representa esquemáticamente en la FIG. 13.

6.3 EFECTO DEL ORDEN DE LOS DOMINIOS Y ENLACES DISULFURO ADICIONALES EN LA FORMACIÓN DE LA MOLÉCULA DE DIACUERPO DE TIPO IgG TETRAMÉRICA

El efecto de la estabilización adicional entre las cadenas polipeptídicas ‘más ligera’ y ‘más pesada’ de la molécula de diacuerpo de tipo IgG tetramérica se investigó mediante la sustitución de los restos seleccionados en las cadenas polipeptídicas por cisteínas. Los restos de cisteína adicionales permiten enlaces disulfuro adicionales entre las cadenas ‘más pesada’ y ‘más ligera’. Adicionalmente, se investigó el orden de los dominios sobre la actividad de unión moviendo el dominio Fc o el dominio bisagra-Fc desde el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica al N-terminal. Aunque la actividad de unión de la molécula que comprendía los enlaces disulfuro adicionales no se modificó con respecto a las moléculas de diacuerpo anteriormente construidas con dichos enlaces, la transferencia del dominio Fc o bisagra-Fc al extremo N-terminal de la cadena polipeptídica ‘más pesada’ que comprendía el diacuerpo mejoró sorprendentemente la afinidad de unión y/o la avidez de la molécula biespecífica por uno o ambos de sus antígenos diana.

Materiales y métodos

Construcción y diseño de moléculas polipeptídicas: Se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir versiones modificadas de las construcciones 5, 6 y 8 presentadas en el Ejemplo 6.2. La construcción 9 (SEQ ID NO: 19) y la construcción 10 (SEQ ID NO: 20) (ambas mostradas esquemáticamente en la FIG. 13) fueron análogas a las construcciones 8 y 6, a excepción de que el dominio Fc o el dominio bisagra-Fc, respectivamente, se desplazó del extremo C-terminal del polipéptido al N-terminal. Además, todos los dominios Fc usados eran dominios Fc de IgG1 de tipo natural. La construcción 11, SEQ ID NO: 21, (mostrada esquemáticamente en la FIG. 14) era análoga a la construcción 2 del Ejemplo 6.1, salvo que el extremo C-terminal fue diseñado para que comprendiera además la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23). La construcción 12, SEQ ID NO: 22 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 14) era análoga a la construcción 5 del Ejemplo 6.2, salvo que el dominio Fc comprendía además una región bisagra. Asimismo, para las construcciones 11 y 12, el dominio VL de 2B6 y el dominio VH de 2B6 comprendía una sola modificación de aminoácido (G105C y G44C, respectivamente) de modo que una glicina de cada dominio se reemplazó por cisteína.

PCR y construcción del vector de expresión: Todos los protocolos de PCR y de la purificación de los productos de PCR fueron como se describe en el Ejemplo 6.1 y 6.2.

PCR solapante: Los productos finales fueron construidos, amplificados y purificados usando los métodos que se describen en el Ejemplo 6.1 y el Ejemplo 6.2.

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) como se ha descrito anteriormente. Los plásmidos codificantes de las construcciones fueron diseñados como se identifica en la tabla 15:

Tabla 15. CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDO

Construcción codificante	Designación del plásmido	Inserción
9	pMGX0719	Bisagra hu/Fc -hu3G8VL-hu2B6VH
10	pMGX0718	HuFc -hu2B6VL-hu3G8VH
11	pMGX0716	Hu2B6VL(G/C)-hu3G8VH-bisagra hu-FC
12	pMGX0717	Hu3G8VL-hu2B6VH (G/C)-FNRGEC

Expresión del polipéptido/diacuerpo: Tres cotransfecciones separadas en células HEK-293 usando Lipofectamine 2000, como se describe en la sección 6.1, fueron realizadas: pMGX0669 y pMGX0719, que codifican las construcciones 1 y 9, respectivamente; pMGX0669 y pMGX0718, que codifican las construcciones 1 y 10, respectivamente; y pMGX0617 y pMGX0717, que codifican las construcciones 11 y 12, respectivamente. La cotransfección de estos dos plásmidos fue diseñada para conducir a la expresión de un diacuerpo biespecífico (CBD) de tetravalencia con estructura de tipo IgG, inmunoespecífico para FcγRIIB y FcγRIIIA. Tras tres días en cultivo, se recogió el medio condicionado. La cantidad de producto secretado en el medio condicionado fue cuantificada mediante análisis de ELISA anti-Fc de IgG usando el Fc purificado como patrón. A continuación, se normalizaron las concentraciones del producto en las muestras basándose en la cuantificación, y las muestras normalizadas se usaron para los ensayos restantes.

ELISA: Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo secretadas en el medio mediante ELISA de tipo sándwich como se ha descrito *anteriormente citado.* A menos que se indique de otro modo, se usó CD32B para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se usó CD16 conjugado con HRP como sonda.

Transferencia Western: Se analizaron aproximadamente 15 ml de medio condicionado procedente de las tres cotransfecciones anteriormente descritas mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Se tiñó un gel con Simply Blue Safestain (Invitrogen) y se transfirió un gel idéntico a membranas de PVDF (Invitrogen) usando métodos de transferencia convencionales. Tras la transferencia, la membrana se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5 % en 1X PBS. Luego se incubó la membrana en 10 ml de los fragmentos H+L de anticuerpo de cabra anti-IgG1 humana, conjugados con HRP, diluidos 1:8.000 en leche en polvo al 2 % en 1XPBS/Tween 20 al 0,1 % a temperatura ambiente durante 1 h con agitación suave. Tras un lavado con 1X PBS/Tween 20 al 0,3 %, 2X 5 min cada uno, luego 20 min a temperatura ambiente, se reveló la membrana con el sistema de detección de transferencia Western ECL (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La película se reveló en un procesador de rayos X.

Resultados

Los medios condicionados de los sistemas de expresión recombinante que comprendían las construcciones 1 y 9; las construcciones 1 y 10; y las construcciones 11 y 12 se analizaron mediante SDS-PAGE (en condiciones no reductoras) y análisis de transferencia Western (usando un anticuerpo anti-IgG como sonda). La transferencia Western reveló que el producto de los sistemas que comprendían las construcciones 11 y 12 o que comprendían las construcciones 9 y 1 formaron principalmente una sola especie de molécula de aproximadamente 150 kDa (FIG. 15, carriles 3 y 2, respectivamente). Ambos productos tienen enlaces disulfuro internos modificados por ingeniería entre las cadenas 'más ligera' y 'más pesada' que comprenden el diacuerpo. Por el contrario, la molécula sin enlaces disulfuro internos modificados por ingeniería entre las cadenas 'más ligera' y 'más pesada', formadas por las construcciones 10 y 1, formaron al menos dos especies moleculares de pesos moleculares aproximados de 75 - 100 kDa (FIG. 15, carril 1).

A pesar de los resultados de la transferencia Western, se encontró que cada uno de los tres productos fue capaz de unirse a CD32A y CD16 (FIG. 16). Sorprendentemente, con respecto al producto que comprende un dominio Fc-bisagra C-terminal (formado por las construcciones 11 y 12), el producto de ambos sistemas en donde el dominio Fc (o Fc-bisagra) estaba en el extremo amino de la cadena polipeptídica que contiene Fc (es decir,, la cadena "más pesada" (construcciones 9 + 1 y construcciones 10 + 1) demostró una afinidad y/o avidez mejoradas a uno o ambos de sus péptidos objetivo (es decir, CD32B y/o CD16).

6.4 EFECTO DEL SITIO DE ESCISIÓN INTERNO/EXTERNO SOBRE EL PROCESAMIENTO DEL PRECURSOR DE POLIPROTEÍNA Y LA EXPRESIÓN DEL DIACUERPO BIESPECÍFICO COVALENTE; DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DEL DIACUERPO BIESPECÍFICO QUE COMPRENDE PARTES DE LA CADENA LAMBDA Y EL DOMINIO BISAGRA DE IgG HUMANA

Como se describe en el presente documento, las cadenas polipeptídicas individuales del diacuerpo o la molécula de diacuerpo de la divulgación pueden expresarse como una sola molécula precursora de poliproteína. Se ensayó la capacidad de los sistemas recombinantes descritos en los Ejemplos 6.1-6.3 para procesar apropiadamente y expresar un CBD funcional a partir de dicho precursor de poliproteína modificando por ingeniería un ácido nucleico

para que codificara tanto la primera como la segunda cadena polipeptídica de un CBD separadas por un sitio de escisión interno, en particular, un sitio de escisión de furina. El CBD funcional fue aislado del sistema recombinante que comprendía la molécula precursora de poliproteína.

Como se analiza en el Ejemplo 6,3, la adición de los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23), resultó estabilizar la formación del diacuerpo, supuestamente mediante las interacciones entre cadenas potenciadas entre los dominios que comprendían SEQ ID NO: 23 y aquellos dominios que comprendían un dominio Fc o un dominio bisagra-Fc. El efecto estabilizador de esta interacción de tipo cadena lambda/Fc se ensayó en el CBD en el que ninguna cadena polipeptídica comprendía un dominio Fc. Se modificó una cadena polipeptídica del diacuerpo por ingeniería para que comprendiera la SEQ ID NO: 23 en su extremo C-terminal; la cadena polipeptídica asociada se modificó por ingeniería para que comprendiera la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77), que fue derivada del dominio bisagra de una IgG. La comparación de este CBD con el compuesto de las construcciones 1 y 2 (del Ejemplo 6.1) reveló que el CBD que comprendía los dominios derivados del dominio bisagra y la cadena lambda mostraron afinidad ligeramente mayor por uno o ambos de sus epítopos diana.

Materiales y métodos

- *Construcción y diseño de moléculas polipeptídicas:* Precursor de poliproteína: Se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir 2 moléculas precursoras de poliproteína, ambas representadas esquemáticamente en la FIG. 17. La construcción 13 (SEQ ID NO: 95) compuesta del extremo N-terminal de la cadena polipeptídica, el dominio VL de 3G8, el dominio VH de 2.4G2 (que se une a mCD32B), un sitio de escisión de furina, el dominio VL de 2.4G2 y el dominio VH de 3G8. La secuencia de nucleótidos que codifica la construcción 13 se proporciona en la SEQ ID NO: 96. La construcción 14 (SEQ ID NO: 97) (FIG. 17), compuesta del extremo N- terminal de la cadena polipeptídica, el dominio VL de 3G8, el dominio VH de 2.4G2 (que se une a mCD32B), un sitio de escisión de furina, un sitio FMD (proteasa C3 del virus de la fiebre aftosa), el dominio VL de 2.4G2 y el dominio VH de 3G8. La secuencia de nucleótidos que codifica la construcción 14 se proporciona en la SEQ ID NO: 98.

Se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir versiones modificadas de las construcciones 1 y 2 que se presentan en el Ejemplo 6.1. La construcción 15 (SEQ ID NO: 99) (FIG. 17) era análoga a la construcción 1 (SEQ ID NO: 9), presentada en el Ejemplo 6.1, salvo que el extremo C-terminal de la construcción 15 comprendía la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO: 23). La secuencia del ácido nucleico que codifica la construcción 15 se proporciona en la SEQ ID NO: 100. La construcción 16 (SEQ ID NO: 101) (FIG. 17) era análoga a la construcción 2, que se presenta en el Ejemplo 6.1, salvo que el extremo C-terminal de la construcción 16 comprendía la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77). La secuencia del ácido nucleico que codifica la construcción 16 se proporciona en la SEQ ID NO: 102.

PCR y construcción del vector de expresión: Todos los protocolos de PCR y de la purificación de los productos de PCR fueron como se describe en el Ejemplo 6.1 y 6.2.

PCR solapante: Los productos finales fueron construidos, amplificados y purificados usando los métodos que se describen en el Ejemplo 6.1 y el Ejemplo 6.2 con cebadores apropiados.

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) como se ha descrito anteriormente. Los plásmidos codificantes de las construcciones fueron diseñados como se identifica en la tabla 16:

Tabla 16. CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDO

Construcción codificante	Designación del plásmido	Inserción
13	pMGX0750	3G8VL-2.4G2VH-Furina-2.4G2VL-3G8VH
15	pMGX0752	Hu2B6VL-Hu3G8VH-FNRGEC
16	pMGX0753	Hu3G8VL-Hu2B6VH-VEPKSC

Expresión del polipéptido/diacuerpo: Una transfección y una cotransfección en células HEK-293 usando Lipofectamine 2000, como se describe en la sección 6.1, fueron realizadas: individual: pMGX0750, que codifica la construcción 13; y cotransfección: pMGX0752 y pMGX0753, que codifican las construcciones 15 y 16, respectivamente. Tras tres días en cultivo, se recogió el medio condicionado y el producto secretado se purificó por afinidad como se describe.

ELISA: Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo secretadas en el medio mediante ELISA de tipo sándwich como se ha descrito *anteriormente citado.* Se usó CD32B murino para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se usó CD16A conjugado con HRP como sonda para el producto de la cotransfección de las construcciones

15 y 16. Se usó mCD32B como proteína diana y se usó CD16A conjugado a biotina como sonda para el sistema recombinante que comprendía la construcción 13.

Resultados

Se analizó el medio condicionado de los sistemas de expresión recombinante que comprendían las construcciones 13 mediante ELISA de tipo sándwich. El ensayo ELISA ensayó la unión del CBD para determinar la especificidad a cualquiera o ambas de las moléculas mCD32B y/o CD16 (FIG. 18). CD32B sirvió como antígeno diana y se usó CD16A como sonda secundaria. La señal positiva del ensayo ELISA reveló que el CBD h2.4G2-h3G8 heterodimérico producido a partir del precursor de poliproteína tenía especificidad hacia ambos antígenos.

De forma análoga, se ensayó el producto purificado generado mediante la cotransfección de los vectores codificantes de las construcciones 15 y 16 en un ensayo ELISA, y se comparó con el producto que comprendía las construcciones 1 y 2 (Ejemplo 6.1). CD32B sirvió como antígeno diana y se usó CD16A como sonda secundaria. Al igual que con el producto compuesto de las construcciones 1 y 2, se encontró que el producto de las construcciones 15 y 16 era capaz de unirse simultáneamente a CD32B y CD16A. De hecho, el producto de las construcciones 15 y 16 mostró afinidad ligeramente potenciada hacia uno o ambos antígenos diana, es decir, CD32B o CD16A. Esto quizás se deba a la estabilidad y/o a la fidelidad aumentada (con respecto a la interacción del dominio VH-VL de tipo silvestre) de la asociación intercatenaria producida por la interacción de la región de la cadena lambda, FNRGEC (SEQ ID NO: 23) y la región bisagra VEPKSC (SEQ ID NO: 77), que está ausente en el producto compuesto de las construcciones 1 y 2.

6.5 USO DE REACTIVOS DE REDIRECCIÓN DE AFINIDAD DOBLE ("DART") PARA UNIR ENTRE SÍ MÚLTIPLES AFINIDADES

También se describen nuevos reactivos de redireccionamiento de doble afinidad ("DART"), así como nuevas formas de vincular múltiples afinidades. Los "DART" pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos, etc., siendo capaces de este modo de unirse simultáneamente a uno, dos, tres o más epítopos diferentes (que pueden ser de antígenos iguales o diferentes). Las moléculas "DART" además pueden ser monovalentes, bivalentes, trivalentes, tetravalentes, pentavalentes, hexavalentes, etc., siendo capaces de este modo de unirse simultáneamente a uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más moléculas. Como se muestra en la figura 35, estos dos atributos de DART pueden combinarse, por ejemplo, para producir anticuerpos biespecíficos que sean tetravalentes, etc.

Un avance es el desarrollo de una molécula de DART que tenga afinidad por un receptor inmunitario prototipo, huCD32B, así como afinidad por un hapteno, fluoresceína. Esta molécula DART, denominada "2B6/4420", sirve como adaptador universal, capaz de coligar huCD32B con moléculas que interaccionan con las parejas de unión conjugadas a fluoresceína. CD32B es un receptor de Fc que tiene la capacidad de inactivar señales activadoras en virtud del agrupamiento con complejos inmunitarios de señalización de la activación. En su implementación inicial, esta tecnología permite realizar un examen rápido de diversas dianas biológicas para el agrupamiento con huCD32B sin la necesidad de generar nuevas construcciones de DART. La molécula de DART 2B6/4420 puede mezclarse simplemente con un anticuerpo marcado con fluoresceína contra un receptor de superficie celular y, con ello, imitar la acción de una molécula DART con afinidad por ese receptor (FIG. 20). Además, este reactivo permite la unión eficaz de reactivos de afinidad que no se expresen ni produzcan fácilmente, permitiendo superar limitaciones técnicas. Las moléculas de DART que contienen 2B6/4420 son evidentemente útiles como herramientas de investigación y también como candidatos clínicos. Las moléculas de DART 2B6/4420 producidas a partir de células HEK293 pueden unirse simultáneamente a CD32B y a fluoresceína en un ensayo ELISA. Adicionalmente, puede inhibir la proliferación celular mediante el reclutamiento de CD32B al complejo BCR a través de la coligación con CD79. El brazo de 2B6 de la molécula de DART puede sustituirse con una secuencia de anticuerpo diferente o una secuencia de unión que tenga otra especificidad importante.

Materiales y métodos:

Construcciones de plásmidos: La molécula 2B6/4420 se deriva de las secuencias del anticuerpo monoclonal mAb 2B6 humanizado (hu2B6, MGA321) y una versión quimérica Fv de ratón/Fc humano del mAb anti-fluoresceína, 4420. El DART completamente ensamblado consiste en dos polipéptidos, que dan lugar a la unión covalente de las dos regiones Fv. El primer polipéptido consiste en una secuencia señal de secreción seguida por el VL de hu2B6 producido como una proteína de fusión con 4420VH separado por un enlazador consisten en los restos de aminoácidos GGGSGGGG. La secuencia FNRGEC, derivada del extremo C-terminal de cadena ligera kappa, se anexa al extremo C-terminal de este polipéptido. El otro polipéptido consiste en la secuencia señal-4420VL-GGGSGGGG-hu2B6VH, con la secuencia VEPKSC, derivada del extremo C-terminal del fragmento Fd de IgG1 humana, anexado al extremo C-terminal. Las cisteínas en las dos cadenas forman un enlace disulfuro, que une de manera covalente los dos polipéptidos entre sí (FIG. 20). Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos descritos se amplificaron por PCR a partir de los plásmidos existentes, se combinaron por PCR solapante y se clonaron en pCIneo (Promega) entre los sitios Nhe I y EcoR I. Por último, se usó como control una molécula de DART con afinidad por huCD32B y huCD16 (2B6/3G8) que se había construido previamente usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Antibodies: Los anticuerpos monoclonales murinos anti-CD79b humano, CB3.1 y CB3.2 (hibridomas) se obtuvieron del Dr. Cooper MD, Universidad de Alabama en Birmingham, Birmingham AL. Se marcaron CB3.1 y CB3.2 con isotiocianato de fluoresceína (FITC) siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford IL). El fragmento F(ab')2 de un fragmento Fc específico, de IgG de cabra anti-ratón (GAM) se obtuvo de Jackson Laboratories (West Grove, PA). El mAb de ratón anti-huCD32B, 3H7, se produjo y purificó de manera interna. El anticuerpo anti-2B6Fv de cabra se produjo inmunizando cabras con el anticuerpo completo hu2B6 y se purificó por afinidad contra la región Fv de hu2B6. Los anticuerpos HuIgG, FITC-huIgG y anti-IgG de ratón conjugado a HRP se obtuvieron en Jackson Immunoresearch. El anticuerpo anti-cabra conjugado con HRP se obtuvo en Southern Biotech.

Expresión de DART: Se cotransfectaron plásmidos codificantes de cada cadena en células 293H (Invitrogen) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína secretada se recogió 3-4 veces en intervalos de tres días y se purificó por cromatografía de líquidos contra una forma soluble inmovilizada de CD32B.

ELISA: Se capturaron las moléculas de DART 2B6/4420 o 2B6/3G8 en placas MaxiSorp (Nalge Nunc) recubiertas con proteína S marcada con FITC (Novagen), IgG humana o FITC-huIgG. La detección se produjo uniendo el ectodominio de CD32B soluble, seguido de 3H7 (un anticuerpo monoclonal de ratón específico de CD32B), y por último, anticuerpo anti-ratón-HRP. Como alternativa, se realizó la detección uniendo un antisuero purificado por afinidad de un anticuerpo policlonal anti-Fv 2B6 de cabra, seguido de anticuerpo anti-cabra-HRP. Se detectó la actividad de HRP usando un sustrato TMB colorimétrico (BioFXy) y se leyó en un lector de placas para ELISA VersaMax.

Purificación y ensayo de la proliferación de los linfocitos B: Se separaron células mononucleares de sangre periférica mediante un método de gradiente de Ficoll/Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech. RU) usando sangre de donantes sanos. Se aislaron los linfocitos B usando el kit Dynal B Cell Negative Isolation (Dynal Biotechnology Inc., NY) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de los linfocitos B aislados (CD20) fue superior al 90 % como se estimó mediante análisis de FACS. Para el ensayo de proliferación, se sembraron linfocitos B purificados en medio RPMI 1640 completo en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano a una densidad celular de $1x10^5$ células por pocillo en un volumen final de 200 µl y se incubaron durante 48 h en presencia y ausencia de anticuerpos y diacuerpos a 37 ºC en CO_2 al 5 %. Luego se añadió 1 µCi/pocillo de [^{3}H]timidina (Perkin Elmer, Wellesley, MA) y se continuó la incubación durante otras 16-18 h antes de realizar la recogida. La incorporación de [^{3}H]timidina se midió mediante recuento de centello líquido.

Resultados

Para demostrar que 2B6/4420 DART era activo y específico, se realizaron dos experimentos ELISA. En primer lugar, 2B6/4420 o 2B6/3G8 (como control negativo) se unió a una proteína conjugada con fluoresceína (proteína S) que había sido recubierta sobre placas para ELISA. A continuación, el brazo de 2B6 de DART fue acoplado por CD32B soluble. La unión se detectó mediante otro anticuerpo CD32B con un epítopo que no se solapa con el de 2B6, seguido de un anticuerpo secundario conjugado a HRP. Aunque DART 2B6/4420 es capaz de unirse simultáneamente a fluoresceína y a CD32B, DART 2B6/3G8 no tiene dicha capacidad (FIG. 21, Panel A). Cuando las moléculas de DART se capturan en placas recubiertas con CD32B soluble y se detecta la unión mediante un anticuerpo específico de Fv de hu2B6, ambas moléculas de DART muestran una buena unión. Para demostrar que DART 2B6/4420 fue capaz de unir la fluoresceína conjugada a IgG humana (dado que este es el contexto de la implementación inicial de este reactivo), HuIgG, no marcado o marcado con fluoresceína, se unió a placas para ELISA y se usó para capturar DART 2B6/4420. De nuevo, se usó DART 2B6/3G8 como control negativo. Se detectó la unión usando un anticuerpo específico de Fv de Hu2B6. DART 2B6/4420 se une claramente a FITC-HuIgG, pero no se une a HuIgG no marcado, lo que demuestra que esta molécula de DART es capaz de unir fluoresceína conjugada a un anticuerpo y que no hay unión significativa al anticuerpo solo. Como cabía esperar, no se detectó ninguna unión por parte de DART 2B6/3G8 en ninguno de estos contextos.

Se realizaron experimentos para demostrar que DART 2B6/4420 era capaz de funcionar como reactivo de doble afinidad que podría tener un efecto sobre la señalización en el contexto de un ensayo basado en células. Se ha demostrado que la coagregación de CD32B con BCR inhibe la activación de los linfocitos B. Se exploró la capacidad de DART 2B6/4420 para coacoplarse con CD32B estando el BCR recubierto con anticuerpos aCD79b marcados con fluoresceína y para generar la inhibición de la proliferación celular. Se realizó una selección negativa de linfocitos B de sangre humana y se activaron a través del tratamiento usando concentraciones crecientes de anticuerpo de ratón anti-CD79b humano marcado con FITC, los clones CB3.1 y CB3.2, y mediante la adición de un fragmento $F(ab')_2$ de un GAM específico de Fc como reactivo secundario con el fin de reticular el BCR, junto con una concentración fija (5 µg/ml) de DART 2B6/4420 o una cantidad equivalente del DART 2B6/3G8, una molécula que no se dirige a la fluoresceína, por lo tanto se utiliza como control. La proliferación celular, medida como la incorporación de [^{3}H]-timidina, aumentó con concentraciones crecientes del activador del anticuerpo monoclonal anti-CD79b-FITC en ausencia de las moléculas de DART o en presencia de DART 2B6/3G8 de control. La presencia de DART 2B6/4420 produjo una reducción evidente de la proliferación de los linfocitos B a todas las concentraciones del anticuerpo monoclonal anti-CD79b humano-FITC (FIG. 22, Paneles A y B y FIG. 23, Panel A).

No se observó inhibición de la proliferación cuando las linfocitos B recubiertos con CB3.2 no marcado y activados usando las mismas condiciones experimentales se trataron con DART 2B6/4420 demostrando su especificidad hacia su diana (FIG. 23, Panel B). Estos datos demuestran que DART 2B6/4420 puede formar reticulación con CD32B y el BCR, y suministrar una señal inhibidora con capacidad para bloquear la activación de células inducida por el receptor del antígeno.

6.6 DART INMUNOTERAPÉUTICO CONTRA TUMORES MALIGNOS DE LINFOCITOS B QUE EXPRESAN CD32B

Actualmente, los tumores malignos de linfocitos B se tratan usando el anticuerpo anti-CD20 Rituxan®. Algunos tumores malignos de linfocitos B, no obstante, no expresan CD20 ni se vuelven resistentes a Rituxan. Las moléculas de DART de la presente divulgación proporcionan una inmunoterapia alternativa capaz de resolver los problemas asociados con el uso del anticuerpo anti-CD20 Rituxan®.

La molécula MGD261 es una molécula de redirección de afinidad doble (DART) que se une a hCD32B (a través del anticuerpo h2B6) y hCD16A y hCD16B (a través del anticuerpo h3G8).

La eficacia (agotamiento de linfocitos B) y la seguridad de MGD261 se probaron en mCD32-/- hCD16A+ C57Bl/6, mCD32-/- hCD32B+ C57Bl/6 y mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+ C57Bl/6. En este experimento con dosis repetidas, los ratones recibieron 6 inyecciones IV (dos veces a la semana durante 3 semanas). El agotamiento de los linfocitos B se controló mediante FACS. Se controló la seguridad mediante observación al lado de la jaula.

Los datos indican que MGD261 es capaz de producir el agotamiento de los linfocitos B en ratones doblemente transgénicos sin inducir algún efecto secundario significativo.

Datos: Se inyectaron a ratones C57Bl/6 mCD32-/-hCD16 A+, C57Bl/6 mCD32-/- hCD32B+ y ratones C57Bl/6 mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+ de la colonia de reproducción MacroGenics por vía IV en los días 0, 3, 7, 10, 14 y 17 MGD261 (10, 3, 1 o 0,3 mg/kg), o un anticuerpo irrelevante (hE16 10 mg/kg). Se recogió la sangre en los días -19 (antes de la extracción de sangre), 4, 11, 18, 25 y 32 para el análisis de FACS. Tres veces a la semana se registró el estado de salud y la actividad de los animales.

Diseño:

Grupo	Animales		Artículo de ensayo	Dosis (mg/kg)
	n.º	Ratones		
A	4	mCD32-/- hCD16A+	hE16	10
B	5	mCD32-/- hCD16A+	MGD261	10
C	3	mCD32-/- hCD32B+	hE16	10
D	3	mCD32-/- hCD32B+	MGD261	10
E	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	hE16	10
F	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	10
G	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	3
H	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	1
I	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	0,3

Método para el análisis de FACS: Las muestras de sangre completa se recogieron 18 días antes de la administración de h2B6-h3G8 y 4, 11, 18, 25 y 32 días tras el tratamiento. Se analizaron las muestras de sangre para determinar el efecto de la molécula h2B6-h3G8 sobre el recuento de linfocitos B mediante un ensayo basado en FACS. Se usó un protocolo sin lavado para recuentos de linfocitos B, linfocitos T y PMN mediante el uso de cuentas FlowCount, obtenidas de Beckman Coulter. El panel de anticuerpos que se usó para el análisis fue 1A8-FITC para PMN, CD3-PE para linfocitos T, CD19-APC para linfocitos B y CD45-PerCP para leucocitos totales.

Resultados

Los ratones tratados con hE16 o MGD261 (con cualquier concentración) no mostraron ningún signo de malestar en ningún momento durante el experimento.

Se observó el agotamiento de los linfocitos B en los ratones doblemente transgénicos hCD16A y hCD32B. El diacuerpo h2B6-3G8 se acopla a las células efectoras que expresan hCD16A y a los linfocitos B que expresan hCD32B; los acoplamientos fueron necesarios para la destrucción de los linfocitos B. El agotamiento de los linfocitos

B no se observó en ratones unitransgénicos (FIG. 24). No hubo cambios importantes en los linfocitos T ni en el nivel de PMN durante el estudio.

Como una demostración adicional de los inmunoterapéuticos alternativos descritos en el presente documento, un sustituto de MGD261, denominado "2.4G2-3G8 DB" fue construido. La molécula 2.4G2-3G8 DB es una molécula de redirección de doble afinidad (DART) que se une a mCD32B (a través del anticuerpo 2.4G2) y a hCD16A y hCD16B (a través del anticuerpo h3G8).

La eficacia (agotamiento de linfocitos B) y seguridad del diacuerpo 2.4G2-3G8 se ensayó en ratones mCD16-/-, mCD16-/- hCD16A+ C57B1/6, mCD16-/- hCD16B+ y mCD16-/- hCD16A+ hCD16B+. En este experimento con dosis repetidas, los ratones recibieron 9 inyecciones IP (intraperitoneal) (tres veces a la semana durante 3 semanas). El agotamiento de los linfocitos B se controló mediante FACS. Se controló la seguridad mediante observación al lado de la jaula.

Los datos indican que el diacuerpo DB 2.4G2-3G8 es capaz de producir el agotamiento de los linfocitos B en ratones transgénicos hCD16 sin inducir ningún efecto secundario significativo.

Datos: Se inyectaron a ratones C57B1/6 mCD16-/-, mCD16-/- hCD16A+, mCD16-/- hCD16B+ y mCD16-/- hCD16A+ hCD16B+ de la colonia de reproducción MacroGenics por vía IP en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 el DB 2.4G2-3G8 (75 ug/ratón) o PBS. Se recogió la sangre en los días -10 (antes de la extracción de sangre), 4, 11 y 18 para el análisis de FACS. Tres veces a la semana se registró el estado de salud y la actividad de los animales.

Grupo	n.º de animales	Dosis µg/ms	Artículo de ensayo	Vía	Puntos temporales de extracción de sangre
A	2 mCD16-/-	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
B	2 mCD16-/- 16A+ B6	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
C	2 mCD16-/- 16B+	-	PBS	IP	Días -10, 4,11, 18
D	2 mCD16-/- 16A+ 16B+	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
E	6 mCD16-/-	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Días - 10, 4, 11, 18
F	6mCD16-/- 16A+B6	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Días - 10, 4, 11, 18
G	6 mCD16-/- 16B+	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Días - 10, 4, 11, 18
H	6 mCD16-/- 16A+ 16B+	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Días -10, 4, 11, 18

Método para el análisis de FACS: Se extrajeron muestras de sangre completa 10 días antes de la administración de la molécula 2.4G2-3G8 y 4, 11 y 18 días después de iniciarse el tratamiento. Se analizaron las muestras de sangre para determinar el efecto de la molécula 2.4G2-3G8 sobre el recuento de linfocitos B mediante un ensayo basado en FACS. Se usó un protocolo sin lavado para recuentos de linfocitos B, linfocitos T y PMN mediante el uso de tubos TruCOUNT, obtenidos en BD Immunocytometry System. El panel de anticuerpos que se usó para el análisis fue 1A8-FITC para PMN, CD3-PE para linfocitos T, CD19-APC para linfocitos B y CD45-PerCP para leucocitos totales.

Resultados

Los ratones tratados con hE16 o 2.4G2-3G8 no mostraron ningún signo de malestar en ningún momento durante el experimento.

Se observó el agotamiento de los linfocitos B en los ratones mCD16-/- hCD16A+ o mCD16-/- hCD16A+ hCD16B+, pero no en los ratones mCD16-/-. Estos datos indican que las células efectoras que portan hCD16A fueron necesarias para la destrucción de los linfocitos B (FIG. 25). No hubo cambios importantes en los linfocitos T ni en el nivel de PMN durante el estudio.

Modelo intravenoso (IV): Se ensayó la actividad antitumoral de la molécula MGD261 usando un modelo intravenoso (IV) de la estirpe celular tumoral humana Raji. La estirpe celular Raji es una estirpe celular de linfoma de Burkitt humano que expresa hCD32B. Cuando se inyectan por vía intravenosa en ratones mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/-, las células tumorales se localizan en la columna vertebral y producen la parálisis de las patas traseras.

Los datos indican que MGD261 es capaz de bloquear el crecimiento de las células tumorales Raji *in vivo* en ratones mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/-. Los datos indican que MGD261 puede usarse en el tratamiento de tumores malignos de linfocitos B que expresen CD32B en los seres humanos.

Datos: Se inyectó a ratones C57B1/6 mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/- de doce-veinte semanas de edad de la colonia de reproducción MacroGenics por vía IV en el día 0 $5x10^6$ células Raji. En los días 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 y 30 los ratones también fueron tratados por vía intraperitoneal (IP) con 250, 25 o 2,5 µg de MGD261 o con PBS (control negativo). Después se observó a los ratones a diario y se documentó el peso corporal dos veces a la semana. Los ratones que desarrollaron parálisis de las patas posteriores fueron sacrificados.

Resultados: Los ratones tratados con PBS murieron entre el día 25 y el día 50. Los ratones tratados con MGD261 sobrevivieron al menos hasta el día 90 (FIG. 26). El aumento de la supervivencia tiene significación estadística. Una comparación de las curvas de supervivencia usando la prueba de rangos logarítmicos dio una χ^2 de 96,46 (df9; valor de p< 0,0001).

6.7 EXPRESIÓN DE DART EN PROCARIOTAS

Se realizaron experimentos para demostrar la capacidad para producir DART en hospedadores no mamíferos. Por consiguiente, se transformó *Escherichia coli* con un plásmido que expresaba DART, y se controló la expresión de DART.

Materiales y métodos:

Construcción del plásmido: 3G8 es un anticuerpo monoclonal humanizado contra HuCD16. La molécula de DART descrita en este caso consiste en dos cadenas unidas de manera covalente, cada una de las cuales tiene un dominio VL seguido de un espaciador, luego un VH seguido de un resto de Cys en un buen contexto para formar un enlace disulfuro con la cadena opuesta. La secuencia de DART que codifica 3G8VL-GlyGlyGlySerGlyGlyGlyGly (SEQ ID NO: 10)-3G8VH-LeuGlyGlyCys se amplificó por PCR a partir de una construcción de expresión eucariota existente y se digirió con las enzimas Nco I y EcoR I. El vector diana fue pET25b (+) (Novagen), que contiene una secuencia líder *pelB* para la secreción en *E. coli*. Antes de la inserción de las secuencias de DART 3G8/3G8, el vector fue modificado de la siguiente manera: En primer lugar, El promotor T7 fue reemplazado por el promotor *lac* de menor actividad para favorecer la expresión soluble, aunque a menor nivel de proteínas bajo su control. Adicionalmente, se introdujeron dos mutaciones puntuales para eliminar dos codones Met internos presentes al principio del sitio de clonación múltiple (MCS) para favorecer el inicio en el Met presente al principio de la secuencia líder *pelB*. La molécula de DART que se produce con esta construcción consiste en dos brazos de región V que tienen la misma especificidad, en concreto, HuCD16.

Expresión: Se transformaron células BL21DE3 (Novagen) con el plásmido pET25b(+) *T7-lac+* 3G8/3G8 y se usó una colonia resistente a la ampicilina para sembrar un caldo de cultivo. Cuando el cultivo alcanzó las 0,5 unidades de DO600, se añadió IPTG 0,5 mM para inducir la expresión. El cultivo se desarrolló a 30 °C durante 2 horas y se recogió medio libre de células.

Purificación: DART 3G8/3G8 se purificó en un proceso de dos etapas usando cromatografía de afinidad y de exclusión molecular. La molécula de DART fue capturada del medio condicionado usando cromatografía de afinidad. Específicamente, CD16A se acopló a Sepharose 4B (GE Healthcare) activado con CNBr. La resina CD16A-Sepharose se equilibró en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 antes de cargarla. Tras terminar la carga, se lavó la resina con tampón de equilibrado antes de realizar la elución de DART unido con glicina 50 mM a pH 3,0. La molécula de DART eluida se neutralizó de inmediato con Tris/HCl 1 M pH 8,0 y se concentró usando un concentrador de tipo centrifugación (Vivaspin 20, 10k MWCO PES, VivaScience Inc.). La molécula de DART concentrada además se purificó por cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada en PBS.

Resultados

1,7 litros del medio condicionado con el cultivo de *E. coli* fueron procesados a través de la columna CD16A-Sepharose. El rendimiento de DART fue de 0,12 mg. El análisis de DART purificado por SDS-PAGE y SEC demostró una compatibilidad con la molécula de DART de control expresada en células de mamífero (CHO) (FIG. 27).

Ensayo de unión de ELISA para la molécula de DART h3G8-h3G8 expresada en E. coli La expresión de DART h3G8-h3G8 en *E. coli* se midió usando un ensayo de ELISA. Se usaron 50 µl/pocillo de una solución 2 µg/ml del anticuerpo específico de Fv anti-h3G8, 2C11 para recubrir una placa de 96 pocillos Maxisorp en tampón carbonato a 4 ºC durante la noche. Se lavó la placa tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1 %) y luego se bloqueó con BSA al 0,5 % en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir la molécula de DART que se iba a ensayar. Durante el bloqueo, h3G8-h3G8 DART, h2B6-h3G8 DART y h2B6-h2B6 DART expresados en *E. coli* (control negativo) se diluyeron en 1 µg/ml y 0.3 µg/ml en PBST/BSA. Se añadieron 50 µl/pocillo de las moléculas de DART diluidas a cada pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS-T tres veces, se añadieron a la placa 50 µl/pocillo de una solución 0,1 µg/ml de la proteína de fusión sCD16-Fc biotinilada. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS-T tres veces, se usaron 50 µl/pocillo de una dilución 1:5000 de estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) para la detección y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló usando

80 ul/pocillo del sustrato TMB. Tras 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H_2SO_4 al 1 %. Se leyó la DO450 nm usando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura usando el software GraphPadPrism 3.03 (FIG. 28).

6.8 MUERTE DE LINFOCITOS B HUMANOS INDUCIDA POR DART

Se incubaron células PBMC humanas durante una noche con: CD16-CD32B - hu3G8-hu2b6 (descrito anteriormente); ch2B6-aglyc - anticuerpo 2B6 quimérico aglicosilado (descrito en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos, pendiente de tramitación, publicada como US2005 / 0260213) y CD16-CD79. Las secuencias de ADN y de proteína codificada de CD16-CD79 son las siguientes:

H3G8VL-CB3.1VH

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 226):

```
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga       50
gagggccacc atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg      100
atagttttat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc      150
ctcatctata ctacatccaa tctagaatct ggggtcccag acaggtttag      200
tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc agcctgcagg      250
ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac      300
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg      350
cggaggccag gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg      400
gggcttcagt gaagctgtcc tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc      450
tactggatga actgggtgaa gcagaggcct ggacaaggcc ttgaatggat      500
tggtatggtt gatccttcag acagtgaaac tcactacaat caaatgttca      550
aggacaaggc cacattgact gttgacaaat cctccagcac agcctacatg      600
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag      650
agctatgggc tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagttg      700
agcccaaatc ttgt                                             714
```

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:227)

```
DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL       50
LIYTTSNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSNEDPY      100
TFGQGTKLEI KGGGSGGGGQ VQLQQPGAEL VRPGASVKLS CKASGYTFTS      150
YWMNWVKQRP GQGLEWIGMV DPSDSETHYN QMFKDKATLT VDKSSSTAYM      200
QLSSLTSEDS AVYYCARAMG YWGQGTSVTV SSVEPKSC                   238
```

CB3.1VL-h3G8VH

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 228):

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca       50
accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg      100
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac      150
cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt      200
cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg      250
aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg      300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg      350
aggcggaggc caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc      400
ccacacagac cctcacactg acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc      450
acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt cagcctcccg ggaaggctct      500
agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc tataatccag      550
ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta      600
gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg      650
tgctcaaata aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg      700
tcactgtgag ctcattcaac aggggagagt gt                         732
```

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:229)

```
DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN       50
RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP      100
LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS      150
TSGMGVGWIR QPPGKALEWL AHIWWDDDKR YNPALKSRLT ISKDTSKNQV      200
VLTMTNMDPV DTATYYCAQI NPAWFAYWGQ GTLVTVSSFN RGEC            244
```

Se ensayó la apoptosis mediante análisis de FACS como el porcentaje de la población PI+anexina-V+ de linfocitos B (linfocitos CD20+) en la población total no regulada por FSC/SSC (FIG. 29).

6.9 DART 8B5-CB3.1

8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC

La molécula 8B5VL se amplificó usando H9 y Igh630R como cebadores, como molde, se usó ch8B5Lc. CB3.1VH se amplificó usando como cebadores Igh628F e Igh629R, como molde, se usó ch8B5Hc. Se incorporó la secuencia enlazadora a los cebadores Igh630R e Igh628F. El enlazador C-terminal y el codón de terminación fueron incorporados del cebador Igh629R. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron entre sí en una proporción equimolar, luego se amplificaron usando como cebadores H9 e Igh629R. El producto de PCR solapado se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en el vector pCIneo.

CB3.1VL-8B5VH-FNRGEC

CB3.1 VL se amplificó usando H9 e Igh630R, que compartía la misma secuencia que 8B5VL en FR4, como cebadores, y como molde, chCB3.1 Lc. 8B5VH se amplificó usando como cebadores Igh631F e Igh640R, y como molde, ch8B5Hc. La secuencia enlazadora fue incorporada a los cebadores Igh630R e Igh631F. El enlazador C-terminal y el codón de terminación fueron incorporados del cebador Igh640R. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron entre sí en una proporción equimolar, luego se amplificaron usando como cebadores H9 e Igh640R. El producto de PCR solapado se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en el vector pCIneo.

Marcador anti-flag-8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC

Se insertó un marcador anti-flag entre la secuencia señal y 8B5VL por PCR solapante. La secuencia señal y el marcador Flag se amplificaron usando como cebadores H9 e Igh647R, y como molde, ch8B5Lc. La molécula 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC se amplificó de nuevo usando como cebadores Igh647F e Igh629R, y como molde, 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron entre sí en una proporción equimolar, luego se amplificaron usando como cebadores H9 e Igh629R. El producto de PCR solapado se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en el vector pCIneo.

8B5VL-CB3.1VH-LGGC

Para generar un enlazador C-terminal diferente en la construcción 8B5VL-CB3.1 VH-VEPKSC, la construcción se amplificó de nuevo usando como cebadores H9 e Igh646R. El enlazador LGGC C-terminal fue integrado en el

cebador Igh646R. El producto de PCR se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI y se clonó en el vector pCIneo.

CB3.1VL-8B5VH-LGGC

Se usó la misma estrategia para crear CB3.1 VL-8B5 VH-LGGC. El enlazador LGGC C-terminal fue integrado en el cebador Igh648R, y se usó como molde CB3.1 VL-8B5 VH-FNRGEC. El producto de PCR se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI y se clonó en el vector pCIneo.

Marcador anti-flag-8B5VL-CB3.1VH-LGGC

También se usó la misma estrategia para crear el marcador anti-flag-8B5VL-CB3.1VH-LGGC. El enlazador LGGC C-terminal fue integrado en el cebador Igh648R, y se usó como molde el marcador anti-Flag-8B5VL-CB3.1 VH-VEPKSC. El producto de PCR se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI y se clonó en el vector pCIneo.

Secuencia de nucleótidos de 8B5-CB3.1-VEPKSC (SEQ ID NO: 230):

```
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga       50
aagagtcagt ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa      100
gctggcttca gcagaaacca gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc      150
gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa aggttcagtg gcagtgagtc      200
tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct gaagattttg      250
cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct      300
gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt      350
ccaactgcag cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga      400
agctgtcctg caaggcttct ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac      450
tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt gaatggattg gtatggttga      500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacaaggcca      550
cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc      600
ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta      650
ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcagttgag cccaaatctt      700
gt                                                          702
```

Secuencia de aminoácidos de 8B5-CB3.1-VEPKSC (SEQ ID NO: 231):

```
DIQMTQSPSS LLAALGERVS LTCRASQEIS GYLSWLQQKP DGTIKRLIYA       50
ASTLDSGVPK RFSGSESGSD YSLTISSLES EDFADYYCLQ YFSYPLTFGA      100
GTKLELKGGG SGGGGQVQLQ QPGAELVRPG ASVKLSCKAS GYTFTSYWMN      150
WVKQRPGQGL EWIGMVDPSD SETHYNQMFK DKATLTVDKS SSTAYMQLSS      200

LTSEDSAVYY CARAMGYWGQ GTSVTVSSVE PKSC                       234
```

Secuencia de nucleótidos de CB3.1-8B5-FNRGEC (SEQ ID NO: 232):

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca       50
accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg      100
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac      150
cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt      200
cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg      250
aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg      300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg      350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac      400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt      450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg      500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg      550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt      600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta      650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag      700
tctcctcgtt caacagggga gagtgt                               726
```

Secuencia de aminoácidos de CB3.1-8B5-FNRGEC (SEQ ID NO: 233):

```
DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN       50
RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP      100
LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCEASGFTFS      150
DAWMDWVRQS PEKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDSKSS      200
VYLQMNSLRA EDTGIYYCGA LGLDYWGQGT TLTVSSFNRG EC             242
```

8B5VL-CB3.1VH-LGGC

Se amplificó 8B5VL usando como cebadores H9 e Igh694R, como molde, se usó ch8B5Lc. 8B5VH se amplificó usando como cebadores Igh695F e Igh696R, como molde, se usó ch8B5Hc. La secuencia enlazadora fue incorporada a los cebadores Igh694R e Igh695F. La molécula HuIgG1Fc se amplificó usando como cebadores Igh355F e Igh366R, como molde, se usó ch8B5Hc. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron entre sí en una proporción equimolar, luego se amplificaron usando como cebadores H9 e Igh366R. El producto de PCR solapado se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en el vector pCIneo.

Secuencia de nucleótidos de 8B5VL-CB3.1VH-LGGC (SEQ ID NO: 234):

```
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga       50
aagagtcagt ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa      100
gctggcttca gcagaaacca gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc      150
gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa aggttcagtg gcagtgagtc      200
tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct gaagattttg      250
cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct      300
gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt      350
ccaactgcag cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga      400
agctgtcctg caaggcttct ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac      450
tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt gaatggattg gtatggttga      500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacaaggcca      550
cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc      600
ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta      650
ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcactggga ggctgc          696
```

Secuencia de aminoácidos de 8B5VL-CB3.1VH-LGGC (SEQ ID NO: 235):

```
DIQMTQSPSS LLAALGERVS LTCRASQEIS GYLSWLQQKP DGTIKRLIYA      50

ASTLDSGVPK RFSGSESGSD YSLTISSLES EDFADYYCLQ YFSYPLTFGA     100
GTKLELKGGG SGGGGQVQLQ QPGAELVRPG ASVKLSCKAS GYTFTSYWMN     150
WVKQRPGQGL EWIGMVDPSD SETHYNQMFK DKATLTVDKS SSTAYMQLSS     200
LTSEDSAVYY CARAMGYWGQ GTSVTVSSLG GC                        232
```

Secuencia de nucleótidos de CB3.1-8B5-LGGC (SEQ ID NO: 236):

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca       50
accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg      100
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac      150
cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt      200
cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg      250
aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg      300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg      350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac      400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt      450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg      500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg      550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt      600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta      650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag      700
tctcctcgct gggaggctgc                                      720
```

Secuencia de aminoácidos de CB3.1-8B5-LGGC (SEQ ID NO: 237):

```
DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN       50
RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP      100
LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCEASGFTFS      150
DAWMDWVRQS PEKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDSKSS      200
VYLQMNSLRA EDTGIYYCGA LGLDYWGQGT TLTVSSLGGC                 240
```

Cebadores:

Lgh628F (SEQ ID NO: 238):
ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtc caactgcagc agcctgg 47
Lgh629R (SEQ ID NO: 239):
tttgaattct aacaagattt gggctcaact gaggagacgg tgactgagg 49
Lgh630R (SEQ ID NO: 240):
gcctccgcct ccggatccgc ctcctttcag ctccagcttg gtccc 45
Lgh631F (SEQ ID NO: 241):
ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg aagcttgagg agtctgg 47
Lgh640R (SEQ ID NO: 242):
tttgaattct aacactctcc cctgttgaac gaggagactg tgagagtgg 49
Lgh644R (SEQ ID NO: 243):
tttgtcgtca tcatcgtctt tgtagtcgga gtggacacct gtggagag 48
Lgh646R (SEQ ID NO: 244):
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgactg ag 42
Lgh647F (SEQ ID NO: 245):
caaagacgat gatgacgaca aagacattca gatgacacag tctcc 45
Lgh648R (SEQ ID NO: 246):
tttgaattct agcagcctcc cagcgaggag actgtgagag tgg 43

Expresión: Las construcciones 5 y 6, o 6 y 7, u 8 y 9, o 9 y 10, los plásmidos de expresión codificados (FIG. 30) se cotransfectaron en células HEK-293 para expresar el DART 8B5-CB3.1 con o sin marcador anti-flag usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). El medio condicionado se recogió cada tres días tres veces. El medio condicionado se purificó luego usando la columna por afinidad de CD32B.

ELISA: Se realizó el ensayo ELISA de la siguiente manera: Se usaron 50 µl/pocillo de 2 ug/ml de CD32B-Fc para recubrir una placa de 96 pocillos Maxisorp en tampón de carbonato a 4 °C durante la noche. Se lavó la placa tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1 %) y luego se bloqueó con BSA al 0,5 % en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir la proteína de fusión de Fc monocatenaria que se iba a ensayar. Durante el bloqueo, se diluyó DART 8B5-CB3.1 en una serie de diluciones dobles comenzando con 2 µg/ml. Se transfirieron 25 µl/pocillo de la molécula de DART diluida mezclados con 25 µl/pocillo de ch8B5 a 50 ng/ml de la placa de dilución a la placa para ELISA. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS-T tres veces, se añadieron a la placa 50 µl/pocillo de $F(ab')_2$ de cabra anti-$F(ab')_2$ de IgG humana conjugado a HRP diluido a 1:10.000 (Jackson ImmunoResearch). La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo del sustrato TMB. Tras 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H_2SO_4 al 1 %. Se leyó la DO450 nm usando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura usando el software GraphPadPrism 3.03 (FIG. 31).

6.10 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DART TETRAVALENTE DE TIPO Ig

Se emplearon cuatro cadenas polipeptídicas para producir una especie de DART de tipo Ig que tuviera sitios de unión al antígeno tetravalentes (FIG. 32; FIG. 33). La especie de DART de tipo Ig tiene propiedades únicas, puesto que sus dominios pueden estar diseñados para unirse al mismo epítopo (para formar una molécula de DART de tipo Ig específica de un epítopo, tetravalente, con la capacidad de unirse a cuatro moléculas de antígeno idénticas), o a diferentes epítopos o antígenos. Por ejemplo, sus dominios pueden diseñarse para unirse a dos epítopos del mismo antígeno (para formar un tetravalente, específico de mono-antígeno, bi-epítopo específico DART similar a Ig), o a epítopos de diferentes moléculas de antígeno para formar un DART similar a tetravalente que tiene un par de sitios de unión específicos para un primer antígeno y un segundo par de sitios de unión específicos para un segundo antígeno). Se pueden producir fácilmente moléculas híbridas que tengan combinaciones con dichos atributos.

Para ilustrar las características de dicha especie de DART de tipo Ig, se produjo una molécula de DART de tipo Ig tetravalente ilustrativa que tenía un par de sitios de unión específicos de CD32 y un segundo par de sitios de unión específicos de CD16A. Esta especie de DART de tipo Ig se produjo usando las cuatro siguientes cadenas polipeptídicas:

Secuencia de nucleótidos de 2.4G2-3G8-hKappa
(SEQ ID NO: 247):

```
gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat cttgctgcct ctcctggaga       50
aagtgtttcc atcaattgca aggcaagtga gagcattagc aagtatttag      100
cctggtatct acagaaacct gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat      150
gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg aggttcagtg gcagtggatc      200
tggtacagat ttcactctca ccatcagaag cctggagcct gaagattttg      250
gactctatta ctgtcaacag cattatgaat atccagccac gttcggttct      300
gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt      350
taccctgaaa gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc cagaccctca      400
gtctgacttg ttctttctct gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt      450
gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag ggtctagagt ggctggcaca      500
catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg aagagccgac      550
tgacaatctc caaggatacc tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc      600
agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc      650
cgcctggttt gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctcac      700
tgggaggctg cggcggaggg agccgtacgg tggctgcacc atcggtcttc      750
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt      800
gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg      850
tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag      900
gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa      950
agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg     1000
gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt           1044
```

Secuencia de aminoácidos codificada de 2.4G2-3G8-hKappa
(SEQ ID NO: 248):

```
DVQMTQSPSN LAASPGESVS INCKASESIS KYLAWYLQKP GKANKLLMYD       50
GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTIRSLEP EDFGLYYCQQ HYEYPATFGS      100
GTKLEIKGGG SGGGGQVTLK ESGPGILQPS QTLSLTCSFS GFSLRTSGMG      150
VGWIRQPSGK GLEWLAHIWW DDDKRYNPAL KSRLTISKDT SSNQVFLKIA      200
SVDTADTATY YCAQINPAWF AYWGQGTLVT VSSLGGCGGG SRTVAAPSVF      250
IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ      300
DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC       350
```

Secuencia de nucleótidos de 3G8-2.4G2-hG1
(SEQ ID NO: 249):

```
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca       50
gagggccacc atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg      100
atagttttat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc      150
ctcatctata ctacatccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag      200
tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg      250
aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac      300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg      350
cggaggcgag gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg      400
gaaggtccct gaaactctcg tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac      450
tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca acgacgggtc tggagtgggt      500
cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga gactccgtga      550
agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg      600
caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac      650

agagactacg ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag      700
tttcagtcac tgtctcctca ctgggaggct gcggcggagg gagcgcctcc      750
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc      800
tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac      850
cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc      900
ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt      950
gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga     1000
atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gcccaaatct     1050
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg     1100
gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga     1150
tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa     1200
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa     1250
tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg     1300
tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac     1350
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat     1400
ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc     1450
catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc     1500
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca     1550
gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct     1600
ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag     1650
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta     1700
cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa                      1734
```

Secuencia de aminoácidos codificada de 3G8-2-4G2- hG1
(SEQ ID NO: 250):

```
DTVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL       50
LIYTTSNLES GIPARFSASG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQQSNEDPY      100
TFGGGTKLEI KGGGSGGGGE VELVESGGGL VQPGRSLKLS CAASGFTFSD      150
YYMAWVRQAP TTGLEWVASI SYDGGDTHYR DSVKGRFTIS RDNAKSSLYL      200
QMDSLRSEDT ATYYCATETT GIPTGVMDAW GQGVSVTVSS LGGCGGGSAS      250
TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT      300
FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS      350
CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE      400
DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY      450
KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV      500
KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ      550
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK                              578
```

Los preparados de moléculas de DART de tipo Ig con las secuencias anteriores se obtuvieron de diferentes aislados de plásmidos y se denominaron "Ig DART 1" e "Ig DART 2". Se comparó la capacidad de estas especies de DART de tipo Ig para unirse a mCD32-hCD16A en un ensayo de ELISA con la del medio solo, una molécula de DART que tenía un solo sitio de unión a CD32 y un solo sitio de unión a CD16A ("DART"), y el anticuerpo mAb anti-ch-mCD32 de control (FIG. 34). Se encontró que la molécula de DART de tipo Ig de la presente divulgación tiene mucho mayor afinidad de unión al antígeno que cualquier DART o anticuerpo de control.

6.11 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DIACUERPOS BIESPECÍFICOS CD32B-CD79-1 Y CD32B-CD79-2

Los genes que codifican CD79VL-CD32B VH (Secuencia 1), CD32BVL-CD79VH-1 (Secuencia 2) y CD32BVL-CD79VH-2 (Secuencia 3) se clonaron en el vector de expresión pEE13, obteniéndose las construcciones de expresión 1, 2 y 3, respectivamente. El plásmido de expresión de la construcción 1 se cotransfectó junto con el plásmido de expresión 2 o 3 en células HEK-293 para preparar diacuerpos biespecíficos CD32B-CD79-1 y CD32B-CD79-2, respectivamente. El medio condicionado se recogió cada tres días tres veces. El medio condicionado se purificó luego usando la columna por afinidad de CD32B.

Se realizó el ensayo ELISA de la siguiente manera: Se usaron 50 µl/pocillo de 2 µg/ml de CD32B-Fc para recubrir una placa de 96 pocillos Maxisorp en tampón de carbonato a 4 °C durante la noche. Se lavó la placa tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1 %) y luego se bloqueó con BSA al 0,5 % en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir la proteína de fusión de Fc monocatenaria que se iba a ensayar. Durante el bloqueo, se diluyó el diacuerpo biespecífico CD32B-CD79-1 o CD32B-CD79-2 en una dilución en serie de factor de dilución de dos comenzando con 2 µg/ml. Se mezclaron 25 µl/pocillo del diacuerpo biespecífico diluido con 25 µl/pocillo de 50 ng/ml del anticuerpo anti-CD32B, y se añadieron a una placa para ELISA. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS-T tres veces, se añadieron a la placa 50 µl/pocillo de $F(ab')_2$ de cabra anti-$F(ab')_2$ de IgG humana conjugado a HRP diluido a 1:10.000 (Jackson ImmunoResearch). La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo del sustrato TMB. Tras 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H_2SO_4 al 1 %. Se leyó la DO450 nm usando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura usando el software GraphPadPrism 3.03. El experimento reveló que los diacuerpos biespecíficos CD32B-CD79-1 y CD32B-CD79-2 eran capaces de unirse de manera inmunoespecífica a CD32-Fc con una afinidad equivalente a la del anticuerpo de control anti-CD32B. A continuación, se proporcionan las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos codificadas de las construcciones descritas anteriormente:

Secuencia 1 - secuencia de nucleótidos de CD79VL-CD32BVH
(SEQ ID NO: 251):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca        50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg       100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac       150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt       200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg       250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg       300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg       350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac       400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt       450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg       500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg       550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt       600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta       650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag       700
tctcctcgct gggaggctgc                                       720
```

Secuencia 2 - Secuencia de aminoácidos de CD79VL-CD32BVH
(SEQ ID NO: 252):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN        50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP       100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS       150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS       200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC                  240
```

Secuencia 3 - secuencia de nucleótidos de CD32BVL-CD79VH-1
(SEQ ID NO: 253):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga        50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa       100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc       150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc       200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg       250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg       300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt       350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga       400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac       450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga       500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacagagtca       550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc       600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta       650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc           696
```

Secuencia 4 - secuencia de aminoácidos de CD32BVL-CD79VH-1
(SEQ ID NO: 254):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA       50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG      100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN      150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQMFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS      200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC                         232
```

Secuencia 5 - secuencia de nucleótidos de CD32BVL-CD79VH-2
(SEQ ID NO: 255):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga       50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa      100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc      150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc      200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg      250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg      300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt      350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga      400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac      450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga      500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca      550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc      600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta      650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc          696
```

Secuencia 6 - secuencia de aminoácidos de CD32BVL-CD79VH-2
(SEQ ID NO: 256):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA       50

ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG      100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN      150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS      200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC                         232
```

6.12 CONSTRUCCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LOS DIACUERPOS BI-FUNCIONALES H8B5-HBCRC

Se construyó un diacuerpo que contiene regiones variables capaces de unirse a CD32 y al complejo del receptor de linfocitos B ("BCRC").

Clonación. Las construcciones se construyeron utilizando PCR estándar/PCR solapante:

h8B5VL-G3SG4-hBCRCVH M48I-LGGC:
Se amplificó un 8B5 VL completamente humanizado (que reconoce a CD32) utilizando lgh321F e lgh788R como cebadores. Se amplificó hBCRCVH M48I utilizando lgh784F e lgh386R como cebadores. Los productos de la PCR se purificaron en gel y se mezclaron y se amplificaron utilizando lgh321F y lgh386R. El fragmento de la PCR solapante se clonó posteriormente en pEE6 en el sitio Xbal-EcoRI. "G3SG4" es un enlazador que tiene la secuencia: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10).
hBCRCVL R45N-G3SG4-h8B5VH -LGGC
hBCRCVL R45N se amplificó utilizando lgh321F e lgh785R como cebadores. h8B5VH se amplificó utilizando lgh787F e lgh786R como cebadores. Los productos de la PCR se purificaron en gel y se mezclaron y se amplificaron utilizando lgh321F y lgh786R. El fragmento de la PCR solapante se clonó posteriormente en pEE13 en el sitio Xbal-EcoRI.

Construcción de un solo vector. El pEE6hHBCRCVL R45N-h8B5VH se digirió en los sitios Bgl II-Sal I y se purificó un fragmento de 3,3 kb y se insertó en pEE13hHBCRCVL 45N-h8B5VH en los sitios BamHI-SalI. Bgl II y el BamH I comparten extremos cohesivos compatibles. La secuencia del DART y los cebadores utilizados para construir el DART se muestran a continuación:

hHBCRCVL. Secuencia de nucleótidos de R45N-h8B5VH-LGGC
(SEQ ID NO: 257):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca        50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg       100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac       150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt       200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg       250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg       300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg       350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac       400

ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt       450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg       500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg       550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt       600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta       650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag       700
tctcctcgct gggaggctgc                                       720
```

hHBCRCVL. Secuencia de aminoácidos de R45N-h8B5VH-LGGC
(SEQ ID NO: 258):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN        50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP       100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS       150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS       200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC                  240
```

Secuencia de nucleótidos de H8B5VL-hHBCRCVH M48I-LGGC
(SEQ ID NO: 259):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga        50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa       100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc       150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc       200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg       250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg       300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt       350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga       400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac       450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga       500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacagagtca       550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc       600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta       650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc           696
```

Secuencia de aminoácidos de H8B5VL-HBCRCVH M48I-LGGC
(SEQ ID NO: 260):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA        50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG       100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN       150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQMFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS       200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC                          232
```

Cebador Lgh321F (SEQ ID NO: 261):
cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36
Cebador Lgh386R (SEQ ID NO: 262):

tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tggtc 45
Cebador Lgh784F (SEQ ID NO: 263):
ggcggatccg gaggcggagg ccaggttcag ctggtgcag 39
Cebador Lgh785R (SEQ ID NO: 264):
cctccggatc cgcctccttt gatctcaagc ttggtccc 38
Cebador Lgh786R (SEQ ID NO: 265):
tttgaattct agcagcctcc caggctggag acggtcacca gg 42
Cebador Lgh787F (SEQ ID NO: 266):
ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg cagcttgtgg agtc 44

El plásmido de expresión Hu3G8VL 1-G3SG4-Hu2B6VH 4-LGGC se cotransfectó junto con Hu2B6VL 5-G3SG4-Hu3G8VH 5-LGGC en las células HEK-293 para producir el diacuerpo biespecífico Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1 que reconoce a CD32 y a CD79. Al mismo tiempo, Hu2B6VL 5-G3SG4-Hu2B6VH 4-LGGC y Hu3G8VL 1-G3SG4-Hu3G8VH 5-LGGC se transfectaron individualmente en células HEK-293 para hacer producir los diacuerpos Hu2B6 4.5 y Hu3G8 5.1. Después de tres días en cultivo, se recogieron los medios condicionados y se caracterizaron mediante ELISA de unión. Los resultados de ese experimento se muestran en la figura 36.

Diseño experimental: Se recubrieron 100 ng / pocillo de FcRIIb-G2-Agly soluble en una placa Maxisorp de 96 pocillos en tampón de carbonato a 40 ° C durante la noche. La placa se lavó tres veces con PBS / Tween20 al 0,1% y luego se bloqueó con BSA al 0,5% en PBS / Tween 20 al 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir los diacuerpos. Una serie de dilución doble de medio acondicionado de diacuerpos biespecíficos Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1, el diacuerpo Hu2B6 4.5 y el diacuerpo hu3G8 5.1 se añadió a cada pocillo partiendo a 25 ng/pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS/Tween20 al 0,1% tres veces, Se añadieron 10 ng/pocillo de FcRIIIa-G2-Biotina a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS/Tween20 al 0,1% tres veces, se usaron para la detección 50 ul de una dilución 1:5.000 de estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech). Después de 45 minutos de incubación a temperatura ambiente, la placa se lavó con PBS/Tween20 al 0,1% tres veces y se reveló utilizando un sustrato TMB. Tras 10 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 1% de H2SO4. La DO450 nm se leyó mediante el programa SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura usando el software GraphPadPrism 3.03.

6.13 CONSTRUCCIÓN DE DIACUERPOS IgDART

Se construyeron diacuerpos IgDART que contienen regiones variables capaces de unirse a CD32 y al complejo receptor de linfocitos B ("BCRC"). El primer diacuerpo empleó un enlazador LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267) entre las secuencias VH y las secuencias Fc de la molécula. El segundo diacuerpo empleó un enlazador LEIK que tiene la secuencia: LEIK (SEQ ID NO: 268) o un enlazador TVSS que tiene la secuencia TVSS (SEQ ID NO: 269). Las secuencias de las cadenas de estos diacuerpos y polinucleótidos codificantes se muestran a continuación:

H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa
(SEQ ID NO: 270):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA       50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG      100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN      150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS      200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GCGGGSRTVA APSVFIFPPS      250
DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS      300
TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC             343
```

Las secuencias de H8B5VL se fusionan con las secuencias de hBCRCVH mediante el enlazador GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) ubicado en la posición 108-115. Las secuencias hBCRCVH se fusionan con las secuencias Fc mediante el enlazador LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267) ubicado en la posición 229-236 (ambas se muestran subrayadas anteriormente). El polinucleótido que codifica la secuencia de H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa es:
(SEQ ID NO: 271):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga        50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa       100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc       150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc       200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg       250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg       300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt       350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga       400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac       450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga       500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca       550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc       600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta       650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgcggcg       700
gagggagccg aactgtggct gcaccatcgg tcttcatctt cccgccatct       750
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa       800
cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc       850
aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc       900
acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa      1000
acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg      1050
tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag                         1082
```

donde las secuencias codifican los enlazadores: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) y LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267) están ubicadas en las posiciones 322-345 y 685-708, respectivamente (ambas se muestran subrayadas arriba).

HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hGl
(SEQ ID NO: 272):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN        50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP       100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS       150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS       200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC GGGSASTKGP       250
SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV       300

LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT       350
HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV       400
KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV       450
SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY       500
PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF       550
SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK                                   574
```

Las secuencias hBCRCVL se fusionan con las secuencias H8B5VH mediante el enlazador GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) ubicado en la posición 113-120. Las secuencias de H8B5VH se fusionan con las secuencias Fc mediante el enlazador LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267) ubicado en la posición 237-244 (ambas se muestran subrayadas arriba). El polinucleótido que codifica la secuencia HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hGl es:
(SEQ ID NO: 273):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca         50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg        100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac        150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt        200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg        250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg        300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg        350
aggcggaggc gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac        400
ctggaggatc cctgagactc tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt        450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc ccaggcaagg ggcttgagtg        500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg        550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt        600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta        650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg        700
tctccagcct gggaggctgc ggcggaggga gcgcctccac caagggccca        750
tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc        800
ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt        850
cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc        900
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc        950
cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca       1000
gcaacaccaa ggtggacaag agagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact       1050
cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt       1100
cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc       1150
ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc       1200
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa       1250
gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca       1300
ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc       1350
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa       1400
agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg       1450
agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat       1500
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa       1550
ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct       1600
acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc       1650
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag       1700
cctctccctg tctccgggta aa                                    1722
```

donde las secuencias codifican los enlazadores: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) y LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267) están ubicadas en las posiciones 337-360 y 709-732, respectivamente (ambas se muestran subrayadas arriba).

H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa (SEQ ID NO: 274):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA         50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG        100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN        150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS        200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVLEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT        250
ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL        300
TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC                        335
```

Las secuencias de H8B5VL se fusionan con las secuencias de HBCRCVH mediante el enlazador GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) ubicado en la posición 108-115. Las secuencias HBCRCVH se fusionan con las secuencias Fc mediante el enlazador LEIK (SEQ ID NO: 268) ubicado en la posición 225-228 (ambas mostradas subrayadas anteriormente). El polinucleótido que codifica la secuencia de H8B5VL-HB-CRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa es:
(SEQ ID NO: 275):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga        50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa       100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc       150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc       200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg       250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg       300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt       350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga       400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac       450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga       500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca       550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc       600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta       650
ctgggggcaa gggaccacgg tcctggagat caagcgaact gtggctgcac       700
catcggtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact       750
gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt       800
acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc caggagagtg       850
tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg       900
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt       950
cacccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag      1000
agtgt                                                       1005
```

donde las secuencias codifican los enlazadores: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) y LEIK (SEQ ID NO: 268) están ubicadas en las posiciones 322-345 y 673-684, respectivamente (ambas se muestran subrayadas arriba).

HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1 = HBCRCVL R45N-h8B5VH_-hG1
(SEQ ID NO: 276):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN        50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP       100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS       150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS       200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPS       250

SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS       300
LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA       350
PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG       400
VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP       450
IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW       500
ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA       550
LHNHYTQKSL SLSPGK                                            566
```

Las secuencias HBCRCVL se fusionan con las secuencias h8B5VH mediante el enlazador GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) ubicado en la posición 113-120. Las secuencias de h8B5VH se fusionan con las secuencias Fc mediante el enlazador TVSS (SEQ ID NO: 269) ubicado en la posición 233-236 (ambas se muestran subrayadas arriba). El polinucleótido que codifica HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1 es:
(SEQ ID NO: 277):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca       50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg      100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac      150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt      200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg      250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg      300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg      350
aggcggaggc gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac      400
ctggaggatc cctgagactc tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt      450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc ccaggcaagg ggcttgagtg      500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg      550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt      600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta      650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg      700
tctccagcgc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc      750
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtcaagga      800
ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca      850
gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc      900
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta      950
catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag     1000
ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca     1050
cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa    1100
ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg     1150
acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc     1200
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag     1250
cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga     1300
atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc     1350
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt     1400
gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc     1450
tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg     1500
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct     1550
ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga     1600
gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct     1650
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa       1698
```

donde las secuencias codifican los enlazadores: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) y TVSS (SEQ ID NO: 269) están ubicadas en las posiciones 337-360 y 697-708, respectivamente (ambas se muestran subrayadas arriba).

6.14 OPTIMIZACIÓN DE ENLAZADORES

Como se ha analizado anteriormente, los diacuerpos IgDART de la presente descripción contienen preferentemente enlazadores entre las secuencias VH y las secuencias Fc de la molécula. Se realizaron experimentos para optimizar los enlazadores con el fin de maximizar el rendimiento y la actividad. Se emplearon los siguientes enlazadores.

SEQ ID NO	Enlazador
278	FNRGECGGGS
279	FNRGECLQVYYRM
280	LEGEEG
281	LEGEEGC
282	LEIK
283	LGEEG
284	LGEEGC
285	LGGCGGGS

(continuación)

SEQ ID NO	Enlazador
286	LGKKG
287	LGKKGC
288	LKGKKG
289	LKGKKGC
290	LQVYYRM
291	LQVYYRMC
292	TVSS
293	VEPKSCGGGS
294	VEPKSCYLYLRARV
295	VQVHYRM
296	VQVHYRMC
297	YLYLRARV
298	YLYLRARVC

Los enlazadores anteriores se introdujeron en los plásmidos para producir un conjunto de diacuerpos IgDART que tienen diferentes combinaciones de enlazadores:

Plásmido pMGX	Cadena A Enlazador SEQ ID NO	pEE13.4	Cadena B Enlazador SEQ ID NO	pEE6.4	ELISA (mg/ml)	Proteína purificada (Después de SEC) (1 litro)
900	285	√	285	√	0,799	0,3 mg
901	283	√	286	√	0,628	0,4 mg
902	284	√	287	√	0,896	0,47 mg
903	280	√	288	√	0,557	
904	281	√	289	√	0,450	0,4 mg
905	293	√	278	√	0,360	
906	294	√	279	√	N/A	
907	282	√	292	√	N/A	
908	297	√	295	√	0,428	0,2 mg
909	297	√	290	√	0,305	0,3 mg
910	298	√	296	√	N/A	
911	298	√	291	√	0,218	

Se determinaron las propiedades de agregación de los IgDARTS producidos.

Enlazadores de IgDART	Proteína total (mg)	Oligómero %	Monómero %	Fragmento %	Rango SB
900A/900B	0,51	12	45	43	4
901A/901B	0,72	5	83	12	1
902A/902B	0,78	21	48	31	4
903A/903B	0,5	3	84	13	1

(continuación)

Enlazadores de IgDART	Proteína total (mg)	Oligómero %	Monómero %	Fragmento %	Rango SB
904A/904B	0,66	16	65	26	4
905A/905B	0,5	20	60	20	3
908A/908B	0,5	13	65	17	2
908A/909B	0,38	22	50	28	3
910A/911B	0,2	45	10	45	5

Los datos mostraron inesperadamente que las construcciones que tienen enlazadores, tales como los empleados en 901A/901B; 903A/903B; y 908A/908B dieron resultados dramáticamente superiores (menos oligomerización y/o menos producción de fragmentos) que las construcciones que tienen enlazadores, tales como 910A/911B.

6.15 DART DE BUCLE E/BUCLE K

Como se apreciará en vista de lo anterior, los polipéptidos individuales de un DART biespecífico pueden formar dos especies de homodímeros y una especie de heterodímero. En una realización de la presente divulgación, puede agregarse un polipéptido cargado al extremo C-terminal de uno o más preferentemente, ambos polipéptidos DART. Mediante la selección de polipéptidos de carga opuesta para los polipéptidos individuales del DART biespecífico, la inclusión de dichos polipéptidos cargados favorece la formación de heterodímeros y disminuye la formación de homodímeros. Preferentemente, un polipéptido cargado positivamente contendrá un contenido sustancial de arginina, glutamina, histidina y/o lisina (o mezclas de dichos aminoácidos) y un polipéptido cargado negativamente contendrán un contenido sustancial de aspartato o glutamato (o una mezcla de dichos aminoácidos). Los polipéptidos cargados positivamente que contienen un contenido sustancial de lisina y los polipéptidos cargados negativamente que contienen un contenido sustancial de glutamato son particularmente preferidos. Con el fin de maximizar la atracción electrostática entre dichos polipéptidos con carga opuesta, se prefiere emplear polipéptidos capaces de asumir espontáneamente una conformación helicoidal.

Por lo tanto, en una realización preferida, se agregará un "bucle E" cargado positivamente a uno de los polipéptidos que se usan para formar un DART biespecífico y se agregará un "bucle K" cargado negativamente al segundo de los polipéptidos del DART (Figura 37).

Un bucle E particularmente preferido tiene la secuencia: $(EVAALEK)_4$:
SEQ ID NO: 299 EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

Un bucle K particularmente preferido tiene la secuencia: $(KVAALKE)_4$:
SEQ ID NO: 300 KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Un polipéptido DART preferido que posea dicho bucle E tendrá la secuencia general: [Dominio VL]-[GGGSGGGG]-[Dominio VH]-$[(EVAALEK)_4]$-GGGNS, donde VL es el dominio de Ig variable ligero de DART, GGGSGGGG es la SEQ ID NO: 10, VH es el dominio de Ig variable pesado de DART, $(EVAALEK)_4$ es la SEQ ID NO: 299 y GGGNS es la SEQ ID NO: 301. Un polipéptido DART preferido que posea dicho bucle K tendrá la secuencia general: [Dominio VL]-[GGGSGGGG]-[Dominio VH]-$[(KVAALKE)_4]$-GGGNS, donde VL es el dominio de Ig variable ligero de DART, GGGSGGGG es la SEQ ID NO: 10, VH es el dominio de Ig variable pesado de DART, $(KVAALKE)_4$ es la SEQ ID NO: 300, y GGGNS es la SEQ ID NO: 301.

6.16 DART QUE CONTIENEN Fc DE BUCLE E/BUCLE K

En una realización adicional, las regiones Fc se pueden ligar a los bucles E y/o K de los DART de bucle E o K.

La ampliación de la separación entre las regiones Fc y el dominio VH del DART de un DART que contiene Fc es deseable en los casos en los que una disposición menos separada de dichos dominios da como resultado una interacción reducida entre dichos dominios y sus ligandos de unión o interfiere de otro modo con el ensamblaje del DART. Aunque pueden emplearse separadores de cualquier secuencia de aminoácidos, es preferible emplear separadores que formen bucles de hélice α, para extender y proyectar al máximo el dominio Fc lejos de los dominios variables (Figura 37). Debido a que los polipéptidos enrollados de carga opuesta anteriormente descritos, además, se combinan para promover la formación de heterodímeros, dichas moléculas son separadores particularmente preferidos. Dichas moléculas de Fc-DART que contienen bucles proporcionan beneficios similares a los de los Fc-DART, incluyendo una semivida en suero y un reclutamiento de la función efectora mejorados. Los polipéptidos bucle E y bucle K descritos anteriormente son particularmente preferidos para este propósito.

Por lo tanto, en una realización preferida, el DART de bucle E que contiene Fc tendrá la secuencia general: [Dominio VL]-[GGGSGGGG]-[Dominio VH]-[(EVAALEK)$_4$]-GGG-FC dominio que comienza con D234 (numeración de Kabat), donde VL es el dominio de Ig variable ligero de DART, GGGSGGGG es la SEQ ID NO: 10, VH es el dominio de Ig variable pesado de DART y (EVAALEK)$_4$ es la SEQ ID NO: 299.

De forma análoga, en una realización preferida, el DART de bucle K que contiene Fc tendrá la secuencia general: [Dominio VL]-[GGGSGGGG]-[Dominio VH]-[(KVAALKE)$_4$]-GGG-dominio Fc que comienza con D234 (numeración Kabat), donde VL es el dominio de Ig variable ligero de DART, GGGSGGGG es la SEQ ID NO: 10, VH es el dominio de Ig variable pesado de DART y (KVAALKE)$_4$ es la SEQ ID NO: 300.

Como se indica anteriormente, una molécula de DART que contiene bucle o una molécula de DART que contiene Fc que contiene bucle puede contener solo uno de dichos separadores de bucle o puede contener más de uno de dichos separadores (por ejemplo, dos separadores, preferentemente de carga opuesta, de los cuales uno está ligado a cada uno de los dominios VH de los polipéptidos de DART). Al unir la región Fc a dichas moléculas separadoras, la capacidad para producir versiones bivalentes, tetravalentes, etc., de las moléculas de Fc-DART se mejora mediante el intercambio de cadenas (Figura 39). Como se muestra en la figura 39, se pueden producir moléculas Fc-DART que forman monómeros o dímeros, dependiendo de si el dominio Fc está ligado a uno o a ambos dominios DART VH.

6.17 ACTIVIDAD FUNCIONAL DE DART QUE CONTIENEN FC DE BUCLE E/BUCLE K

Se produjeron especies de Fc-DART de bucle E y/o bucle K a partir de moléculas de DART biespecíficas que tienen: (1) las regiones variables ligeras y pesadas del anticuerpo que reacciona con CD79b (complejo BCR), CB3 y (2) las regiones variables ligeras y pesadas de una variante de baja afinidad (denominada variante "YA") del anticuerpo que reacciona con CD32B, 2B6. Esta región variable de la cadena ligera de este anticuerpo difiere de la del anticuerpo 2B6 en que contiene mutaciones: N50Y y V51A. Por lo tanto, El anticuerpo YA2B6 tiene una secuencia de región variable de cadena ligera:

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRTSQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASE
SISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNTWPFTFGGGTKVEI
K **(SEQ ID NO: 302).**

La secuencia de la región variable de la cadena pesada de este anticuerpo es:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWMGVIDP
SDTYPNYNKKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARNGDSDYYS
GMDYWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 303);**

o

Se seleccionó el anticuerpo de baja afinidad ya que se unirá preferentemente a CD32B *in cis* En células que expresan CD79b (linfocitos B). Como tal, la configuración disminuirá la interacción con otras células que expresan CD32B (monocitos, células endoteliales, hígado), así como la interacción en trans no deseable.

Se prepararon derivados de bucle E y/o de bucle K y derivados que contenían Fc de bucle E y/o K de dichos DART h2B6YAhCB3. Se usó cromatografía de exclusión por tamaños para analizar el tamaño aproximado y la heterogeneidad de las moléculas producidas. Como se muestra en la figura 40, los dímeros se formaron a partir de DART de bucle E/bucle K que tienen una única región Fc unida a un dominio de bucle K así como de DART de bucle E/bucle K que tienen una única región Fc enlazada a un dominio de bucle E. El monómero deseado, así como las moléculas de dímero se recuperaron de las preparaciones en las que las regiones Fc se unieron a los bucles E y K de la misma molécula DART, siendo el monómero el producto mayoritario formado. La figura 41 muestra la posible estructura de las moléculas de dímero producidas.

Las fracciones de cromatografía de exclusión por tamaños se analizaron utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida SDS para analizar más a fondo las estructuras de las moléculas producidas (Figura 42). Los derivados de DART de bucle E/bucle K (sin región Fc) migraron en forma de dos bandas predominantes, cada una de aproximadamente 28 kD (correspondientes al polipéptido que contiene KFc y un polipéptido que contiene EFc ligeramente más pequeño) y una banda menos prominente a aproximadamente 49 kD (correspondiente al DART de bucle E/bucle K). Las fracciones de monómero de los derivados de DART que contienen Fc de bucle E/bucle K (EFc/K o E/KFc) de la cromatografía de exclusión por tamaños mostraron solo la banda de peso molecular mayor o menor a aproximadamente 28 kD (correspondiente a si el DART fue el DART que contiene KFc (banda de mayor peso molecular) o el DART que contiene EFc (banda de menor peso molecular). El material predominantemente

migró a aproximadamente 49 kD (correspondiente al DART de bucle E/bucle K). También se observaron bandas significativas de peso molecular más alto.
Se preparó un ELISA de unión biespecífica para caracterizar las moléculas producidas. Se dispuso CD79 sobre una placa de ELISA. Después, se ligaron los DART a la placa. La unión a DART se detectó utilizando sCD32B-biotina seguido de incubación con estreptavidina-HRP. Como se muestra en la figura 43, Los derivados de DART h2B6YAhCB3 de bucle E/bucle K que contienen Fc (EFc/K o E/KFc) mostraron una mejora significativa de la unión relativa a un DART h2B6YAhCB3, o un derivado de DART EFc/KFc h2B6YAhCB3.

La reticulación de anticuerpos que se han unido a CD79b conduce a la activación de las linfocitos B (Van Kooten, C. et al. (1997) "Cross-Linking Of Antigen Receptor Via Ig-B (B29, CD79b) Can Induce Both Positive And Negative Signals In CD40-Activated Human B Cells," Clin. Exp. Immunol. 110:509-515). Dado que las moléculas de DART h2B6YAhCB3 son capaces de unirse tanto a CD79b como al receptor inhibidor de CD32B, tienen la capacidad de "reclutar" CD32B a sitios de unión a CD79b, y de ese modo bloquear la proliferación de linfocitos B. Para demostrar esta habilidad, los DARTS se incubaron con linfocitos B que habían sido expuestos a anticuerpos capaces de reticular los anticuerpos anti-CD79b unidos. Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 44. Los resultados muestran que los anticuerpos dirigidos únicamente contra CD79b o CD32B (Ch2B6N297Q y ChCB3.1N297Q, respectivamente) no pudieron inhibir la proliferación de linfocitos B. Los derivados de EFc/KFc h2B6YA x hCB3 DART fueron sustancialmente más efectivos en la inhibición de la proliferación de linfocitos B, al igual que h2B6YA x hCB3 DART y el control h2B6YA x hCB3 VF. Se encontró que los DARTS de bucle E/bucle K que tienen solo una región Fc unida (E/KFc h2B6YA x hCB3 DART derivados y EFc/K h2B6YA x hCB3 DART derivados) ejercen la mayor inhibición en la proliferación de linfocitos B.

6.18 MODIFICACIONES DE DART PARA ALTERAR LA SEMIVIDA *IN VIVO*

Como se ha analizado anteriormente, las moléculas de anticuerpo recombinante pequeñas, tales como moléculas monocatenarias biespecíficas (por ejemplo, que poseen una masa molecular de aproximadamente 55 kDa) se eliminan rápidamente de la circulación. Los estudios farmacocinéticos *in vivo* de moléculas DART en ratones mostraron la semivida terminal corta de aproximadamente 2 horas.

En algunas realizaciones, como en el tratamiento de una afección inflamatoria aguda, se desea dicha semivida tan corta, sin embargo, en otras realizaciones tales como en el tratamiento del cáncer y enfermedades y afecciones crónicas, se prefiere que las moléculas de DART de la presente divulgación muestren semividas más largas.

Para mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de las moléculas de DART para dichos usos, pueden modificarse las moléculas de DART para que contengan una porción polipeptídica de una proteína de unión al suero en uno o más de los extremos de la molécula de DART. Muy preferiblemente, dicha porción de polipéptido de una proteína de unión al suero se instalará en el extremo C-terminal de la molécula de DART. Una porción de polipéptido particularmente preferida de una proteína de unión al suero para este propósito es el dominio de unión a la albúmina (ABD) de la proteína G del estreptococo. El dominio de unión a la albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa G148 de Streptococcus es particularmente preferido.

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

Para demostrar la capacidad de una porción polipeptídica de una proteína sérica para prolongar la semivida de un DART, el dominio ABD3 de la proteína G del estreptococo se fusionó con un DART biespecífico recombinante (inmunorreactivo con los antígenos hCD16 y hCD32B) para generar una molécula de anticuerpo recombinante, hCD16-hCD32B ABD-DART (Figura 45). Este ABD-DART mostró una unión específica con ambos antígenos, así como con la albúmina sérica humana (HSA) y fue capaz de redirigir las células efectoras *in vitro*. Comparado con el DART de control, este ABD-DART mostró un fuerte aumento de la semivida en suero en ratones. Este enfoque puede utilizarse como una ruta viable para aumentar la semivida de productos farmacéuticos potencialmente importantes como DART a más de 90 minutos, más de 2 horas, más de 5 horas, más de 10 horas, más de 20 horas, y más preferentemente, más de 30 horas.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Diseño y construcción de ABD DART: Se preparó ABD DART hCD16-hCD32B utilizando como cadena 1: hCD16VL-G3SG4-hCD32BVH-bucle K [$(KVAALKE)_4$] donde CD16VL denota el 3G8 CD16VL, G3SG4 indica la SEQ ID NO: 10, hCD32BVH denota el 2B6 CD32BVH, y $(KVAALKE)_4$ denota la SEQ ID NO: 300;
y como cadena 2:
hCD32BVL-G3SG4-hCD16VH-GGCGGG-bucle E [$(EVAALEK)_4$]-GGGNS-ABD

donde CD32BVL denota CD32BVL, G3SG4 indica la SEQ ID NO: 10, hCD16VH denota CD16VH, GGCGGG es los restos 2-7 de la SEQ ID NO: 267, bucle E [$(EVAALEK)_4$] es la SEQ ID NO: 299, GGGNS es la SEQ ID NO: 301, y ABD es: LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLINNAKT VEGVKALID EILAALP (SEQ ID NO: 304)
Por consiguiente, la secuencia de la cadena 1 (h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-bucle K-GGGNS) es:

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL
LIYTTSNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSNEDPY
TFGQGTKLEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YWIHWVRQAP GQGLEWIGVI DPSDTYPNYN KKFKGRVTMT VVVSTSTAYM
ELRSLRSDDT AVYYCARNGD SDYYSGMDYW GQGTTVTVSS GGCGGGKVAA
LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKEGGGNS **(SEQ ID NO: 305)**

Un polinucleótido preferido que codifica la cadena 1 (h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-bucle K-GGGNS) es:

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct
ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga agatccgtac
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggcgg cggaggccag
gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc
tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct
ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat
aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat
tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctcc
ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag
aaggtcgccg cacttaagga aaaggtcgca gccctgaaag agggcggcgg gaattct
(SEQ ID NO: 306)

Por consiguiente, La secuencia de la cadena 2 (h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-bucle E-GGGNS-ABD) es:

EIVLTQSPDF QSVTPKEKVT FTCRTSQSIG TNIHWYQQKP DQSPKLLIKE
VSESISGVPS RFSGSGSGTD FTLTINSLEA EDAATYYCQQ SNTWPFTFGG
GTKVEIKGGG SGGGGQVTLR ESGPALVKPT QTLTLTCTFS GFSLSTSGMG

VGWIRQPPGK ALEWLAHIWW DDDKRYNPAL KSRLTISKDT SKNQVVLTMT
NMDPVDTATY YCAQINPAWF AYWGQGTLVT VSSGGCGGGE VAALEKEVAA
LEKEVAALEK EVAALEKGGG NSLAEAKVLA NRELDKYGVS DYYKNLINNA
KTVEGVKALI DEILAALP **(SEQ ID NO: 307)**

Un polinucleótido preferido que codifica la cadena 2 (h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-bucle E-GGGNS-ABD) es:

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc
ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca
gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct
gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga
gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt taccctgaga
gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct
gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag
gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg
aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc
aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt
gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctccg gaggatgtgg cggtggagaa
gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag
gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg aattctctgg ccgaagcaaa agtgctggcc
aaccgcgaac tggataaata tggcgtgagc gattattata agaacctgat taacaacgca
aagaccgtgg aaggcgtgaa agcactgatt gatgaaattc tggccgccct gcct

(SEQ ID NO: 308)

Cada segmento VL y VH se amplificó por PCR utilizando el DART hCD16-hCD32B como plantilla. Para la cadena 2, las secuencias de nucleótidos que contenían el bucle E y ABD se formaron mediante un dímero de cebador y luego se subclonaron en el extremo C-terminal de la región VH de hCD16 utilizando la digestión de restricción y la ligadura. Ambas cadenas se clonaron en el vector pCIneo (Promega, inc.) En los sitios NheI-NotII. Los plásmidos individuales que albergan la cadena1 respectiva digerida en NgoMIV-NheI y los casetes de expresión de la cadena2 digeridos en BstBI-PmeI se clonaron en un solo plásmido para la transfección en células CHO para generar líneas celulares estables.

Expresión y purificación de proteínas: Para la transfección estable, las células CHO-S se transfectaron con ADNc de plásmido de ECD ABD-DART de hCD16-hCD32B. La proteína ABD-DART se purificó por cromatografía de afinidad utilizando la versión soluble del antígeno FcRIIB acoplado a la Sefarosa 4B activada con CNBr. La proteína concentrada se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaños usando Superdex 200HR 10/30.

Ensayo de unión por ELISA: Para la captura basada en CD-16, las placas se recubrieron con antígeno FcRIIB a una concentración de 2 µg/ml a 4 °C durante la noche. Las placas se bloquearon con Peptona al 0,5% en PBS-T. Las proteínas purificadas diluidas en una dilución en serie de dos veces se unieron a la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, la detección se realizó utilizando CD32B biotinilado (50 ng/ml) seguido de estreptavidina conjugada con HRP (1/1000, BD-Pharm). La actividad de HRP se midió mediante la adición de TMB y la placa se leyó en un lector de placas a DO 450nm.

Para la captura de seroalbúmina humana (HSA), las placas se recubrieron con HSA a una concentración de 2µg/ml a 4 °C durante toda la noche. Después de eso, se siguieron los mismos procedimientos para realizar el ELISA de doble afinidad.

Ensayo de ADCC mediado por células mononucleares de sangre periférica: La citotoxicidad se midió mediante un ensayo de liberación de LDH. Se purificaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre humana completa (Lonza Walkersville, Inc, Gaithersburg, MD) mediante centrifugación de gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron 2 x 10^4 células diana en cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo redondo. Se agregan de una a cuatro diluciones en serie de diferentes DART o moléculas de anticuerpos a las células en la placa. Después de eso, se agregan 6 x 10^5 PBMC a los mismos pocillos. La placa se incuba luego durante la noche en una incubadora a 37 °C y 5% de CO_2. La placa se hace girar a 1200 rpm durante 5 minutos, Se transfieren 50 µl de sobrenadante a una placa ELISA de fondo plano. Se añaden 50 µl de solución de sustrato de LDH (Promega) a cada pocillo y la placa se incuba durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se agregan 50 µl de solución de parada a cada pocillo y la placa se lee a 490 nm en una hora. El porcentaje de citotoxicidad de cada pocillo se calcula con la lectura de DO en bruto como

(Muestra - AICC)/(diana máxima - diana espontánea) x 100

donde AICC es la citotoxicidad celular independiente del anticuerpo. La curva de respuesta a la dosis se genera utilizando el software Prism.

Estudio farmacocinético: Se inyectó a ratones C57B1/6 una única inyección intravenosa de hCD16-hCD32B DART a 5 mg/kg. El suero de ratón se recogió antes de la dosis, 2, 30 min; 1, 3, 6, 24 y 72 h. Se cuantificaron las concentraciones de hCD16-hCD32B DART en suero. Los cálculos farmacocinéticos de hCD16-hCD32B DART se realizaron mediante el paquete de software farmacocinético WinNonlin Professional 5.1 (Pharsight Corporation, EE. UU.). Los parámetros se determinaron mediante análisis no compartimental (NCA). El análisis no compartimental se basó en un modelo (Modelo 201) que requiere una inyección intravenosa del medicamento. El método trapezoidal lineal se utilizó para el cálculo de parámetros.

RESULTADOS

Estudio de expresión y unión por ELISA: ABD-DART hCD16-hCD32B se expresó de manera eficaz a una concentración de 6,5 mg por litro en células CHO-S de mamíferos. La actividad de unión de la proteína ABD-DART purificada a los antígenos respectivos se evaluó mediante ELISA. Los resultados mostraron que ABD-DART hCD16-hCD32B se une simultáneamente con ambos antígenos, CD16, así como con CD32B (Figura 46A). El perfil de unión coincide con el control de la unión a la proteína DART hCD16-hCD32B. La afinidad de ABD-DART hCD16-hCD32B purificado a la albúmina sérica humana (HSA) también se demostró mediante ELISA (Figura 46B). El resultado mostró una fuerte unión de la fusión ABD DART a HSA, mientras que no se observó unión con el control hCD16-hCD32B DART.

Citotoxicidad in vitro de ABD-DART: Para demostrar la unión simultánea de este ABD-DART biespecífico a dos antígenos, uno en la célula efectora y uno en la célula diana, se realizó el ensayo de destrucción de células redirigidas. Utilizando PBMC humanas como células efectoras, ABD-DART hCD16-hCD32B indujo una potente citotoxicidad dependiente de la dosis contra líneas de linfocitos B positivas para CD32B, Daudi (Figura 47). El resultado mostró que la potencia de ABD-DART era equivalente a la de DART precursor.

Propiedades farmacocinéticas de ABD-DART: Las propiedades farmacocinéticas de ABD-DART hCD16-hCD32B se analizaron mediante ELISA de muestras de suero después de una dosis única de inyección i.v. en ratones C57B1/6 (Figura 48). Ambas proteínas, DART y ABD-DART mostraron eliminación bifásica de la circulación. El estudio PK de ABD-DART mostró un tiempo de circulación prolongado, con una semivida terminal aumentada de 35,1 h en comparación con 1,2 h para DART regular (Figura 48, Tabla 17). La mejora de las propiedades farmacocinéticas también se demostró mediante la comparación del área bajo la curva (ABC). Para la construcción ABD-DART, el ABC aumentó en un factor de casi 30 después de la fusión con ABD (Tabla 17).

Tabla 17

	ABD-DART	DART
T ½ (h)	35,1	1,2
Cmax (µg/ml)	156,3	103,7
Tmax (h)	0,5	0,033
ABC	4408,2	138,3

En resumen, se diseñó y produjo exitosamente un dominio de unión a la albúmina fusionado proteína DART (denominado ABD-DART). Se observó que el ABD-DART hCD16-hCD32B conserva las especificidades de sus dos determinantes antigénicos reconocidos: CD16 y CD32B. Se encontró que ABD-DART muestra una alta afinidad con la albúmina sérica humana. La fusión de ABD no redujo la actividad biológica (es decir,, la potencia del DART para la muerte de células tumorales redirigidas). La fusión de la molécula de DART con ABD llevó a una mejora sustancial (aumento) en su semivida *in vivo* y logró este objetivo sin un aumento dramático en el tamaño. La capacidad de mantener un tamaño pequeño es significativa y ventajosa, ya que facilita la capacidad del DART para difundirse en los tejidos tumorales.

6.19 DART PARA Her2/RECEPTOR DE LINFOCITOS B

Se construyó un diacuerpo IgDART que contenía regiones variables capaces de unirse a Her2/neu y al receptor de linfocitos T ("TCR").

Como se ha analizado anteriormente, el TCR se expresa de forma nativa por los linfocitos T CD4+ o CD8+ y permite que dichas células reconozcan los péptidos antigénicos que están unidos y presentados por las proteínas de MHC de clase I o clase II de las células presentadoras de antígeno. El reconocimiento de un complejo de pMHC (péptido-MHC) por un TCR inicia la propagación de una respuesta inmunitaria celular que da lugar a la producción de citocinas y a la lisis de la célula presentadora de antígenos. HER2/neu, un miembro importante de la familia ErbB, se ha investigado exhaustivamente debido a su papel en varios carcinomas humanos y en el desarrollo de los mamíferos. (Hynes y Stern (1994) Biochim. Et Biophys. Acta 1198:165-184; y Dougall et al. (1994) Oncogene

9:2109-2123; Lee et al. (1995) Nature 378:394-398). El gen HER2/neu y la proteína HER2/neu se describen en Semba et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82: 6497-6501 y Yamamoto et al. (1986) Nature 319: 230-234 y la secuencia está disponible en GenBank como el número de referencia X03363. HER2/neu comprende cuatro dominios: un dominio extracelular al que se une el ligando; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio de tirosina cinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo-terminal que alberga varios restos de tirosina que pueden fosforilarse. (Plowman et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:1746-1750). La secuencia del dominio extracelular de HER2/neu (ECD) fue descrita por Franklin et al. (2004) Cancer Cell. 5 (4): 317-328, y está disponible en Protein DataBank Record 1S78 (2004).

HER2/neu funciona como un receptor del factor de crecimiento y a menudo se expresa por tumores como el cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de células de vejiga, cáncer de ovario y cáncer de pulmón. HER2/neu está sobreexpresado en 25-30% de los cánceres de mama y ovario en humanos, y se asocia con una progresión clínica agresiva y un pronóstico desfavorable en estos pacientes. (Slamon et al. (1987) Science 235:177-182; Slamon et al. (1989) Science 244:707-712). La sobreexpresión de HER2/neu también se ha observado en otros carcinomas, incluidos los carcinomas del estómago, endometrio, glándulas salivales, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. (Véase, por ejemplo, King et al. (1985) Science 229:974; McCann et al. (1990) Cancer 65:88-92; Yonemura et al. (1991) Cancer Research 51:1034).

Se han desarrollado varios anticuerpos monoclonales e inhibidores de tirosina cinasa de molécula pequeña que se dirigen a HER-1 o HER2/neu, incluyendo, en particular, una variante humanizada de un anticuerpo monoclonal murino conocido como 4D5 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc.) que reconoce un epítopo extracelular (aminoácidos 529 a 627) en el dominio II rico en cisteína de HER2/neu, que reside muy cerca de la región transmembrana de la proteína. Los estudios han demostrado que en las células de cáncer de mama que sobreexpresan HER2/neu, el tratamiento con anticuerpos específicos contra HER2/neu en combinación con agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino, doxoubicina, taxol) provoca una mayor respuesta citotóxica que el tratamiento con quimioterapia sola. (Hancock et al. (1991) Cancer Res. 51:4575-4580; Arteaga et al. (1994) Cancer 54:3758-3765; Pietras et al. (1994) Oncogene 9:1829-1838). Un posible mecanismo por el cual los anticuerpos contra HER2/neu podrían mejorar la respuesta a los agentes quimioterapéuticos es a través de la modulación de la expresión de la proteína HER2/neu o interfiriendo con la reparación del ADN. (Stancovski et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:8691-8695; Bacus et al. (1992) Cell Growth & Diff. 3:401-411; Bacus et al. (1993) Cancer Res. 53:5251-5261; Klapper et al. (1997) Oncogene 14:2099-2109; Klapper et al. (2000) Cancer Res. 60:3384-3388; Arteaga et al. (2001) J Clinical Oncology 19(18s):32s-40s. Aunque en ciertos casos, los anticuerpos anti-HER2/neu como HERCEPTIN® proporcionan un beneficio terapéutico a los pacientes, la mayoría de cánceres de mama y otros pacientes exhiben respuestas refractarias a dichos anticuerpos. Estas respuestas reflejan, en parte, diferencias en el alcance de la sobreexpresión de HER2/neu por las células cancerosas del paciente.

Como consecuencia de contener regiones variables capaces de unirse a Her2/neu y al receptor de linfocitos T ("TCR"), el DART tiene la capacidad de unirse a las células que expresan HER2 y, por lo tanto, de unir a dichas células un dominio capaz de unirse al receptor de linfocitos T. Cuando dichos linfocitos T se unen a este dominio, se activan para iniciar una respuesta inmune que conduce a la destrucción de las células que expresan HER2.

Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos para dicho DART se proporcionan a continuación, mostrándose en texto plano las secuencias de VL y VH, mostrándose el enlazador VL-VH en texto subrayado y la secuencia que codifica el motivo de heterodimerización C-terminal (SEQ ID NO: 313: GFNRGEC o SEQ ID NO: 314: GVEPKSC) mostrada en negrita y cursiva.

secuencia de aminoácidos de TCRVL-HER2VH (SEQ ID NO: 315)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR
FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGQG TKLEIKGGGS GGGGQVQLQQ
SGPELVKPGA SLKLSCTASG FNIKDTYIHW VKQRPEQGLE WIGRIYPTNG YTRYDPKFQD
KATITADTSS NTAYLQVSRL TSEDTAVYYC SRWGGDGFYA MDYWGQGASV TVSS***GFNRGE***
C

secuencia de ácido nucleico que codifica TCRVL-HER2VH (SEQ ID NO: 316)

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg
aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg
ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa
gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg
accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag
tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc
ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa
tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac
aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg
acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct
atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct cc***ggattcaa caggggagag***
tgt

secuencia de aminoácidos de HER2VL-TCRVH (SEQ ID NO: 317)

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVPD
RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV
QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYKFTSYVMH WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK
GRVTITADKS TSTAYMELSS LRSEDTAVHY CARGSYYDYD GFVYWGQGTL VTVSS***GVEPK***
SC

secuencia de ácido nucleico que codifica HER2VL-TCRVH (SEQ ID NO: 318)

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc
atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca
ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat
cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg
ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc
ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt
gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa
ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac
gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctcc***ggagt tgagcccaaa***
tcttgt

En una realización preferida, dichas construcciones se modifican para contener un dominio de bucle E o de bucle K que facilita la formación de heterodímeros (es decir,, dímeros de TCRVL-HER2VH x HER2VL-TCRVH). Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos para dicho DART se proporcionan a continuación, mostrándose las secuencias de VL y VH en texto plano, mostrándose el enlazador VL-VH en el texto subrayado y la secuencia que codifica el enlazador que contiene Cys para la dimerización (GGCGGG; restos 2-7 de la SEQ ID NO: 267) mostrada en cursiva. El bucle E del dominio de heterodimerización del bucle K está doblemente subrayado (la secuencia preferida del "bucle E" es de 4 repeticiones heptaméricas de EVAALEK; SEQ ID NO: 299; la secuencia preferida del "bucle K" es de 4 repeticiones heptaméricas de r KVAALKE (SEQ ID NO: 300). La secuencia que sigue al bucle E o el bucle K no tiene función asignada.

secuencia de aminoácidos de TCRVL-HER2VH-bucle E (SEQ ID NO: 319)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR
FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGQG TKLEIKGGGS GGGGQVQLQQ
SGPELVKPGA SLKLSCTASG FNIKDTYIHW VKQRPEQGLE WIGRIYPTNG YTRYDPKFQD
KATITADTSS NTAYLQVSRL TSEDTAVYYC SRWGGDGFYA MDYWGQGASV TVSS***GGCGGG***
EVAALEKEVA ALEKEVAALE KEVAALEKGG GNS

secuencia de ácido nucleico que codifica TCRVL-HER2VH-bucle E (SEQ ID NO: 320)

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg
aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg
ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa
gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg
accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag
tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc
ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa
tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac
aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg
acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct
atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct *ccggaggatg tggcggtgga*
gaagtggccg cactggagaa agaggttgct gctttggaga aggaggtcgc tgcacttgaa
aaggaggtcg cagccctgga gaaaggcggc gggaattct

Secuencia de aminoácidos de HER2VL-TCRVH-bucle K (SEQ ID NO: 321)

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVPD
RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV
QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYKFTSYVMH WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK
GRVTITADKS TSTAYMELSS LRSEDTAVHY CARGSYYDYD GFVYWGQGTL VTVSS*GGCGG*
*G*KVAALKEKV AALKEKVAAL KEKVAALKEG GGNS

secuencia de ácido nucleico que codifica HER2VL-TCRVH-bucle K (SEQ ID NO: 322)

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc
atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca
ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat
cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg
ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc

ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt
gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa
ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac
gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctcc*ggagg atgtggcggt*
*gga*aaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt
aaggaaaagg tcgcagccct gaaagagggc ggcgggaatt ct

Las moléculas de DART que tienen dominios de unión al receptor de linfocitos T y Her2 (TCR) se probaron para determinar su capacidad para mediar la citotoxicidad en múltiples líneas celulares de cáncer de colon y cáncer de vejiga que se habían caracterizado previamente por presentar bajos niveles de expresión de HER2 (y por lo tanto son refractarias al tratamiento con el anticuerpo anti-Her2/neu, Herceptin®. Las líneas celulares de cáncer de mama analizadas son ZR75-1 (HER2 2+) (FIG. 49A), MCF-7 (HER2 1+) (FIG. 49B) y MDA-MB468 (HER2-ve) (FIG. 49C).

Las líneas celulares no de cáncer de mama analizadas son HT-29 (línea celular de cáncer de colon) (FIG. 49D) y SW780 (línea celular de cáncer de vejiga) (FIG. 49E). Como se muestra en las FIG.49A-E, dichas moléculas de DART fueron sustancialmente más efectivas que HERCEPTIN® en la mediación de la citotoxicidad de líneas celulares derivadas de tumores, tanto en términos de las concentraciones requeridas para lograr una citotoxicidad equivalente, como en términos de los niveles máximos de citotoxicidad observados. Muchas modificaciones y variaciones de esta divulgación pueden realizarse sin apartarse de su alcance, como será evidente para los expertos en la materia.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MacroGenics, Inc.
Johnson, Leslie S.
Huang, Ling S.

<120> DIACUERPOS COVALENTES Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 1301,000714

<150> US 60/671,657
<151> 15/04/2005

<150> US 11/409,339
<151> 17/04/2006

<150> PCT/US06/014481
<151> 17/04/2006

<150> US 60/945,523
<151> 21-06-2007

<150> US 61/019,051
<151> 04-01-2008

<150> US 12/138,867
<151> 13/06/2008

<150> PCT/US08/66957
<151> 13/06/2008

<150> US 61/139,352
<151> 19/12/2008

<150> US 61/156,035
<151> 27/02/2009

<150> US 61/256,779
<151> 30/10/2009

<160> 322

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
1               5                   10
```

<210> 2
<211> 10
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
1 5 10

<210> 3
<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
50 55 60

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

```
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

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 Asp Glu Leu
        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
```

<210> 6
<211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215
```

<210> 7
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

```
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 Gln Phe Lys Trp Tyr
        35                  40                  45

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

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

Gln Asn Trp Leu Asp 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 Thr 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 Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met 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 Ile
            180                 185                 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215
```

<210> 8
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

```
Ala Pro Glu Phe 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln 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 Phe 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

Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln 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 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu 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 Leu Gly Lys
    210                 215
```

<210> 9
<211> 237
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15
```

```
Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

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

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235
```

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1               5
```

<210> 11
<211> 244
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

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

Leu Gly Gly Cys
```

<210> 12
<211> 240
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30


  Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
          35                  40                  45

  Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50                  55                  60

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

  Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                  85                  90                  95

  Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
              100                 105                 110

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

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

  Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
  145                 150                 155                 160

  Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn
                  165                 170                 175

  Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val Val Ser Thr Ser
              180                 185                 190

  Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
          195                 200                 205

  Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp
      210                 215                 220

  Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
  225                 230                 235                 240
```

<210> 13
<211> 241
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60


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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe
    210                 215                 220

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

Cys
```

<210> 14
<211> 470
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95
```

```
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

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

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415
```

```
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 15
<211> 477
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
        195                 200                 205
```

```
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

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

Leu Gly Gly Cys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
                245                 250                 255

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
            260                 265                 270

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        275                 280                 285

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    290                 295                 300

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305                 310                 315                 320

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                325                 330                 335

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
            340                 345                 350

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
        355                 360                 365

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
    370                 375                 380

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
                405                 410                 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
            420                 425                 430

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
        435                 440                 445

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    450                 455                 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 16
<211> 243
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

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

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg
225                 230                 235                 240

Gly Glu Cys
```

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Enlazador más el extremo C-terminal de la cadena kappa de IgG humana

<400> 17

```
Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1               5                  10
```

<210> 18
<211> 477
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

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

Leu Gly Gly Cys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
                245                 250                 255

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
            260                 265                 270

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        275                 280                 285
```

```
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    290                 295                 300

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305                 310                 315                 320

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                325                 330                 335

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
            340                 345                 350

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
        355                 360                 365

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
    370                 375                 380

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
                405                 410                 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
            420                 425                 430

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
        435                 440                 445

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    450                 455                 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 19
<211> 485
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

```
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1               5                   10                  15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
            20                  25                  30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
        35                  40                  45

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65                  70                  75                  80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
                85                  90                  95
```

```
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
            100                 105                 110

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
    130                 135                 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145                 150                 155                 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                165                 170                 175

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
        195                 200                 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
    210                 215                 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
                245                 250                 255

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe
            260                 265                 270

Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
        275                 280                 285

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro
    290                 295                 300

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
305                 310                 315                 320

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
                325                 330                 335

Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            340                 345                 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
        355                 360                 365

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala
385                 390                 395                 400

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr
                405                 410                 415
```

```
Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val
            420                 425                 430

Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
        435                 440                 445

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
    450                 455                 460

Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
465                 470                 475                 480

Ser Leu Gly Gly Cys
                485
```

<210> 20
<211> 469
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

```
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

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 Asp Glu Leu
        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 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    210                 215                 220

Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
225                 230                 235                 240

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe
                245                 250                 255

Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
            260                 265                 270

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro
        275                 280                 285

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
    290                 295                 300

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
305                 310                 315                 320

Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                325                 330                 335

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
            340                 345                 350

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
        355                 360                 365

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala
    370                 375                 380

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr
385                 390                 395                 400

Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val
                405                 410                 415

Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
            420                 425                 430

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
        435                 440                 445

Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
    450                 455                 460

Ser Leu Gly Gly Cys
465
```

<210> 21
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

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

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225                 230                 235                 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
                245                 250                 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305                 310                 315                 320
```

```
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
            340                 345                 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        355                 360                 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
    370                 375                 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385                 390                 395                 400

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
            420                 425                 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
        435                 440                 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
    450                 455                 460

Gly Lys
465
```

<210> 22
<211> 246
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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


Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                245
```

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

```
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1               5
```

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR1 de la región variable de cadena pesada de 2B6

<400> 24

Asn Tyr Trp Ile His
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR1 de la región variable de cadena pesada de 3H7

<400> 25

Asp Ala Trp Met Asp
1 5

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR2 de la región variable de cadena pesada de 2B6

<400> 26

Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2 de la región variable de cadena pesada de 3H7

<400> 27

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

Val Lys Gly

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

<220>

<223> CDR3 de la región variable de cadena pesada de 2B6

<400> 28

Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR3 de la región variable de cadena pesada de 3H7

<400> 29

Tyr Ser Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR1 de la región variable de cadena ligera de 2B6

<400> 30

Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR1 de la región variable de cadena ligera de 3H7

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR2 de la región variable de cadena ligera de 2B6

<400> 32

Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR2 de la región variable de cadena ligera de 2B6

<400> 33

Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR2 de la región variable de cadena ligera de 2B6

<400> 34

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR2 de la región variable de cadena ligera de 3H7

<400> 35

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR3 de la región variable de cadena ligera de 2B6

<400> 36

Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR3 de la región variable de cadena ligera de 3H7

<400> 37

```
Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr Thr
1               5
```

<210> 38
<211> 121
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de la cadena pesada de 2B6

<400> 38

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 - Hu2B6VL-1

<400> 39

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 humanizado - Hu2B6VL-2

<400> 40

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 humanizado - Hu2B6VL-3

<400> 41

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

<400> 42

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Arg Arg Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Trp Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65                  70                  75                  80

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

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

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a Ig del receptor FcgammaRIIB

<400> 43

Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a Ig del receptor FcgammaRIIB

<400> 44

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a Ig del receptor FcgammaRIIB

<400> 45

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a Ig del receptor FcgammaRIIB

<400> 46

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a Ig del receptor FcgammaRIIB

<400> 47

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>

<223> Sitio de unión a Ig del receptor FcgammaRIIB

<400> 48

Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a Ig del receptor FcgammaRIIB

<400> 49

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a Ig para el receptor FcgammaRIIB

<400> 50

Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a Ig del receptor FcgammaRIIB

<400> 51

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a Ig del receptor FcgammaRIIB

<400> 52

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 53
<211> 9

<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a Ig del receptor FcgammaRIIB

<400> 53

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a Ig del receptor FcgammaRIIB

<400> 54

Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 55
<211> 36
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh321F

<400> 55
cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

<210> 56
<211> 47
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh318R

<400> 56
gcctccgcct ccggatccgc ctcctttgat ctccaccttg gtccctc 47

<210> 57
<211> 47
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh319F

<400> 57
ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtt cagctggtgc agtctgg 47

<210> 58
<211> 43
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh320R

<400> 58
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tgg 43

<210> 59
<211> 46
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh315R

<400> 59
gcctccgcct ccggatccgc ctcctttgat ctcaagcttg gtcccc 46

<210> 60
<211> 48
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh316F

<400> 60
ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtt accctgagag agtctggc 48

<210> 61
<211> 47
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh317R

<400> 61
tttgaattcc tagcagcctc ccagtgagct cacagtgacc agagtcc 47

<210> 62
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh339R

<400> 62
ctcaacgcag cctcccagtg agctcac 27

<210> 63
<211> 31
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh340R

<400> 63
aacgcagcct cccagtgagg agacggtgac c 31

<210> 64
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh366R

<400> 64
tttgaattct atttacccgg agacagg 27

<210> 65
<211> 33
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lhg367F

<400> 65
ctgggaggct gcgcagagcc caaatcttgt gac 33

<210> 66
<211> 33
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh368R

<400> 66
gtcacaagat ttgggctctg cgcagcctcc cag 33

<210> 67
<211> 50
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh369R

<400> 67
tttgaattct aacactctcc cctgttgaag cagcctccca gtgaggagac 50

<210> 68
<211> 118
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de anti-CD16A humanizado - Hu3G8VH-1

<400> 68

```
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

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

Cys Ala Arg Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 69
<211> 118
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de anti-CD16A humanizado - Hu3G8VH-5

<400> 69

```
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

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

Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 70
<211> 117

<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de anti-CD16A humanizado - Hu3G8VH-22

<400> 70

```
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 Val 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 Ser Pro Ser
    50                  55                  60

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

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

Cys Ala Arg Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser

        115
```

<210> 71
<211> 111
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de anti-CD16A humanizado - Hu3G8VL-1

<400> 71

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 72
<211> 111
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de anti-CD16A humanizado - Hu3G8VL-43

<400> 72

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

  Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
              100                 105                 110
```

<210> 73
<211> 111
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de anti-CD16A humanizado - Hu3G8VL-22

<400> 73

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 74
<211> 24
<212> ADN
<213> secuencia de ADN de la SEQ ID NO: 10

<400> 74
ggaggcggatccggaggcgg aggc 24

<210> 75
<211> 18
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 75
ttcaacaggg gagagtgt 18

<210> 76
<211> 30
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Enlazador más el extremo C-terminal de la cadena kappa de IgG humana

<400> 76
ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt 30

<210> 77
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

```
Val Glu Pro Lys Ser Cys
1               5
```

<210> 78
<211> 18

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 78
gttgagccca aatcttgt 18

<210> 79
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

```
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1               5                  10                  15

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

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly 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 Ser Asn Gln Val
65                  70                  75                  80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 80
<211> 354
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 80

caggttaccc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60

acttgttctt tctctgggtt ttcactgagg acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120

cagccttcag ggaagggtct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 180

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccag caaccaggta 240

ttcctcaaaa tcgccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg tgctcaaata 300

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctca 354

<210> 81
<211> 354

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 81

caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc ccacacagac cctcacactg 60

acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120

cagcctcccg ggaaggctct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 180

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta 240

gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata 300

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctca 354

<210> 82
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
    50                  55                  60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65                  70                  75                  80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 83
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 83

```
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc     60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac    120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct    180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat    240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac    300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa                                 333
```

<210> 84
<211> 332
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de anti-CD16A humanizado - Hu3G8VL-1

<400> 84

```
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc     60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac    120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct    180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc    240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac    300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aa                                  332
```

<210> 85
<211> 121
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de la cadena pesada de 2B6 humanizado

<400> 85

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 86
<211> 363
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de la cadena pesada de 2B6 humanizado

<400> 86

```
caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc     60

tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc aactactgga tacactgggt gcgacaggcc    120

cctggacaag ggcttgagtg gattggagtg attgatcctt ctgatactta tccaaattac    180

aataaaaagt tcaagggcag agtcaccatg accgtagtcg tatccacgag cacagcctac    240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaacggt    300

gattccgatt attactctgg tatggactac tgggggcaag ggaccacggt caccgtctcc    360

tca                                                                  363
```

<210> 87
<211> 111
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 humanizado

<400> 87

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

  Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
              100                 105                 110
```

<210> 88
<211> 321
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 humanizado

<400> 88

```
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc     60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca    120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg    180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct    240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga    300

gggaccaagg tggagatcaa a                                              321
```

<210> 89
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> sitio de reconocimiento de la escisión de la trombina

<400> 89

```
                        Leu Val Pro Arg Gly Ser
                        1               5
```

<210> 90
<211> 4

<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> sitio de reconocimiento de la escisión del Factor Xa

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa=Glu o Asp

<400> 90

```
Ile Xaa Gly Arg
1
```

Ile Xaa Gly Arg 1

<210> 91
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de reconocimiento de escisión de enterocinasa

<400> 91

```
Asp Asp Asp Asp Lys
1               5
```

<210> 92
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> sitio de reconocimiento de la escisión de la furina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa=cualquier aminoácido

<400> 92

```
Arg Xaa Xaa Arg
1
```

<210> 93
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> sitio de reconocimiento de la escisión de la furina preferido

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa=Lys o Arg

<400> 93

Arg Xaa Xaa Arg
1

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> sitio de reconocimiento de la escisión de AcTEV

<400> 94

Gln Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

<210> 95
<211> 487
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> precursor de la poliproteína de diacuerpo covalente

<400> 95

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
    50                  55                  60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65                  70                  75                  80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
                165                 170                 175

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

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

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
    210                 215                 220

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

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Arg Ala Lys Arg Asp Val Gln Met Thr Gln
                245                 250                 255
```

```
Ser Pro Ser Asn Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Asn
            260                 265                 270

Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln
        275                 280                 285

Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu Leu Met Tyr Asp Gly Ser Thr Leu
    290                 295                 300

Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
305                 310                 315                 320

Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Gly Leu Tyr
                325                 330                 335

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Ala Thr Phe Gly Ser Gly Thr
            340                 345                 350

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr
        355                 360                 365

Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser
    370                 375                 380

Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly
385                 390                 395                 400

Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala
                405                 410                 415

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
            420                 425                 430

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
        435                 440                 445

Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
    450                 455                 460

Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
465                 470                 475                 480

Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
                485
```

<210> 96
<211> 1464
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN de la SEQ ID NO: 97 (precursor de poliproteína de diacuerpo covalente)

<400> 96

```
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc     60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac    120
```

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag 360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg 420

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480

acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga 540

gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660

ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720

ctgggaggct gcggcgggag agctaagagg gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat 780

cttgctgcct ctcctggaga aagtgtttcc atcaattgca aggcaagtga gagcattagc 840

aagtatttag cctggtatct acagaaacct gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat 900

gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg aggttcagtg gcagtggatc tggtacagat 960

ttcactctca ccatcagaag cctggagcct gaagattttg gactctatta ctgtcaacag 1020

cattatgaat atccagccac gttcggttct gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga 1080

tccggaggcg gaggccaggt taccctgaaa gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc 1140

cagaccctca gtctgacttg ttctttctct gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt 1200

gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg 1260

gatgatgaca agcgctataa tccagccctg aagagccgac tgacaatctc caaggatacc 1320

tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac 1380

tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt gcttactggg gccaagggac tctggtcact 1440

gtgagctcac tgggaggctg ctag 1464

<210> 97
<211> 511
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> precursor de la poliproteína de diacuerpo covalente

<400> 97

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

```
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
    50                  55                  60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65                  70                  75                  80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
                165                 170                 175

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

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

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
    210                 215                 220

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

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Arg Ala Lys Arg Ala Pro Val Lys Gln Thr
                245                 250                 255

Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro
            260                 265                 270

Gly Pro Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Asn Leu Ala Ala Ser
        275                 280                 285

Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser
    290                 295                 300

Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu
305                 310                 315                 320

Leu Met Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe
                325                 330                 335
```

```
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu
            340                 345                 350

Glu Pro Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr
        355                 360                 365

Pro Ala Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly
    370                 375                 380

Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile
385                 390                 395                 400

Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe
                405                 410                 415

Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser
            420                 425                 430

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys
        435                 440                 445

Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
    450                 455                 460

Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp
465                 470                 475                 480

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
                485                 490                 495

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
            500                 505                 510
```

<210> 98
<211> 1536
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN de la SEQ ID NO: 99 (precursor de poliproteína de diacuerpo covalente)

<400> 98

gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag 360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg 420

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480

acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga 540

gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660

ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720

ctgggaggct gcggcgggag agctaagagg gcccctgtga agcagaccct gaacttcgac 780

ctgctgaagc tggccggaga cgtggagagc aaccccggcc ccgatgtcca gatgacccag 840

tctccatcta atcttgctgc ctctcctgga gaaagtgttt ccatcaattg caaggcaagt 900

gagagcatta gcaagtattt agcctggtat ctacagaaac ctgggaaagc aaataagctt 960

cttatgtacg atgggtcaac tttgcaatct ggaattccat cgaggttcag tggcagtgga 1020

tctggtacag atttcactct caccatcaga agcctggagc ctgaagattt tggactctat 1080

tactgtcaac agcattatga atatccagcc acgttcggtt ctgggaccaa gctggagatc 1140

aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag gttaccctga aagagtctgg ccctgggata 1200

ttgcagccct cccagaccct cagtctgact tgttctttct ctgggttttc actgaggact 1260

tctggtatgg gtgtaggctg gattcgtcag ccttcaggga agggtctaga gtggctggca 1320

cacatttggt gggatgatga caagcgctat aatccagccc tgaagagccg actgacaatc 1380

tccaaggata cctccagcaa ccaggtattc ctcaaaatcg ccagtgtgga cactgcagat 1440

actgccacat actactgtgc tcaaataaac cccgcctggt ttgcttactg gggccaaggg 1500

actctggtca ctgtgagctc actgggaggc tgctag 1536

<210> 99
<211> 239
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

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

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 100
<211> 720
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 100

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt taccctgaga 360

gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct 420

gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag 480

gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg 540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc 600

aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt 660

gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctcat tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 101
<211> 246
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

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

Val Glu Pro Lys Ser Cys
                245
```

<210> 102
<211> 741
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 102

```
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc     60
```

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag 360

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 420

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct 480

ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat 540

aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg 600

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat 660

tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctca 720

gttgagccca aatcttgtta g 741

<210> 103
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de FR1 de VH de 3G8

<400> 103

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

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

<210> 104
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de FR1 de VH de 3G8

<400> 104

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
20 25 30

<210> 105
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de FR1 de VH de 3G8

<400> 105

```
Gln Val Thr Leu Lys 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
            20                  25                  30
```

<210> 106
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de FR1 de VH de 3G8

<400> 106

```
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 Arg
            20                  25                  30
```

<210> 107
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de FR1 de VH de 3G8

<400> 107

```
Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1               5                   10                  15

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

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR1 de 3G8

<400> 108

```
Thr Ser Gly Met Gly Val Gly
1               5
```

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR1 de 3G8

<400> 109

Thr Ser Gly Val Gly Val Gly
1 5

<210> 110
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR2 de 3G8

<400> 110

Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 111
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR2 de 3G8

<400> 111

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 112
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR2 de 3G8

<400> 112

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

<210> 113
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR2 de 3G8

<400> 113

His Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 114
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR2 de 3G8

<400> 114

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

<210> 115
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR2 de 3G8

<400> 115

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

<210> 116
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR2 de 3G8

<400> 116

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

<210> 117
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR2 de 3G8

<400> 117

```
Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1               5                   10                  15
```

<210> 118
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR2 de 3G8

<400> 118

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

<210> 119
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR2 de 3G8

<400> 119

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

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR2 de 3G8

<400> 120

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

<210> 121
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR2 de 3G8

<400> 121

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

<210> 122
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 122

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Ile Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 123
<211> 29
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 123

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 124
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 124

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

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

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 125

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 126
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 126

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 127
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 127

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
            20                  25
```

<210> 128
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 128

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
            20                  25
```

<210> 129
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 129

```
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
            20                  25
```

<210> 130
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 130

```
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
            20                  25
```

<210> 131
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 131

```
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
            20                  25
```

<210> 132
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 132

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1               5                   10                  15

Ala Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
            20                  25
```

<210> 133
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 133

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
            20                  25
```

<210> 134
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 134

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
            20                  25
```

<210> 135
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 135

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
            20                  25
```

<210> 136
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 136

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
            20                  25
```

<210> 137
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 137

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

      Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
                  20                  25
```

<210> 138
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 138

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
            20                  25
```

<210> 139
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 139

```
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
            20                  25
```

<210> 140
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 140

```
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
            20                  25
```

<210> 141
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 141

```
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
            20                  25
```

<210> 142
<211> 29

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 142

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Ser Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 143
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 143

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 144
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 144

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 145
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 145

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 146
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 146

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 147
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 147

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 148
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 148

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 149
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 149

```
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
            20                  25
```

<210> 150
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 150

```
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
            20                  25
```

<210> 151
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 151

```
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
            20                  25
```

<210> 152
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 152

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1               5                   10                  15

      Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
                  20                  25
```

<210> 153
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 153

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
            20                  25
```

<210> 154
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 154

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
            20                  25
```

<210> 155
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 155

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
            20                  25
```

<210> 156
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 156

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
            20                  25
```

<210> 157
<211> 29
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 157

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
            20                  25
```

<210> 158
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 158

```
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
            20                  25
```

<210> 159
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 159

```
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
            20                  25
```

<210> 160
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 160

```
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
            20                  25
```

<210> 161

<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR3 de 3G8

<400> 161

```
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
            20                  25
```

<210> 162
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR3 de 3G8

<400> 162

```
Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1               5
```

<210> 163
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR3 de 3G8

<400> 163

```
Ile Asn Pro Ala Trp Phe Asp Tyr
1               5
```

<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR3 de 3G8

<400> 164

```
Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Ala Tyr
1               5
```

<210> 165
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * CDR3 de 3G8

<400> 165

Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 166
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR4 de 3G8

<400> 166

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10

<210> 167
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de VH * FR4 de 3G8

<400> 167

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 168
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * FR1 de 3G8

<400> 168

Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

<210> 169
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * FR1 de 3G8

<400> 169

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

<210> 170
<211> 11
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 170

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 171
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 171

Arg Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 172
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 172

Lys Ser Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 173
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 173

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 174
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 174

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 175
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 175

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 176
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 176

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 177
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 177

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 178
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 178

Arg Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 179
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 179

Lys Ser Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 180
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 180

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 181
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 181

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 182
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 182

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 183
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 183

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 184
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 184

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 185
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 185

Arg Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 186
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 186

Lys Ser Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 187
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 187

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 188
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 188

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 189
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 189

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 190
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 190

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 191
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 191

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 192
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 192

Arg Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 193
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 193

Lys Ser Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 194
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 194

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 195
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 195

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 196
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 196

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 197
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 197

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 198
<211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 198

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 199
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 199

Arg Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 200
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 200

Lys Ser Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 201
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 201

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 202
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 202

```
Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1               5                   10
```

<210> 203
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 203

```
Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1               5                   10
```

<210> 204
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR1 de 3G8

<400> 204

```
Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1               5                   10
```

<210> 205
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * FR2 de 3G8

<400> 205

```
Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1               5                   10                  15
```

<210> 206
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR2 de 3G8

<400> 206

```
Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser
1               5
```

<210> 207
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR2 de 3G8

<400> 207

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 208
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR2 de 3G8

<400> 208

Trp Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 209
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR2 de 3G8

<400> 209

Thr Thr Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

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

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR2 de 3G8

<400> 210

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

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

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR2 de 3G8

<400> 211

Asp Ala Ser Asn Leu Ala Thr
1 5

<210> 212
<211> 7

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR2 de 3G8

<400> 212

Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

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

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR2 de 3G8

<400> 213

Ser Thr Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 214
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR2 de 3G8

<400> 214

Ser Thr Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 215
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR2 de 3G8

<400> 215

Thr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 216
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR2 de 3G8

<400> 216

Thr Thr Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 217
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * FR3 de 3G8

<400> 217

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 218
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * FR3 de 3G8

<400> 218

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 219
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR3 de 3G8

<400> 219

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 220
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR3 de 3G8

<400> 220

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 221
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR3 de 3G8

<400> 221

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 222
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR3 de 3G8

<400> 222

Gln Gln Ser Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * CDR3 de 3G8

<400> 223

Gln Gln Ser Asn Glu Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 224
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * FR4 de 3G8

<400> 224

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 225
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de VL * FR4 de 3G8

<400> 225

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 226
<211> 714
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H3G8VL-CB3.1VH

<400> 226

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag 360

gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc 420

tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct 480

ggacaaggcc ttgaatggat tggtatggtt gatccttcag acagtgaaac tcactacaat 540

caaatgttca aggacaaggc cacattgact gttgacaaat cctccagcac agcctacatg 600

cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag agctatgggc 660

tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagttg agcccaaatc ttgt 714

<210> 227
<211> 238
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H3G8VL-CB3.1VH

<400> 227

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu
                165                 170                 175

Thr His Tyr Asn Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp
            180                 185                 190

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

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln
    210                 215                 220

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys
225                 230                 235
```

<210> 228
<211> 732
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CB3.1VL-h3G8VH

<400> 228

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc     60

atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg    120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac    180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc    240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg    300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc    360

caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc ccacacagac cctcacactg    420

acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt    480

cagcctcccg ggaaggctct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc    540

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta    600

gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata    660

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctcattcaac    720

aggggagagt gt                                                        732
```

<210> 229
<211> 244
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CB3.1VL-h3G8VH

<400> 229

```
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Asn Ile Gly
1               5                  10                  15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
            20                  25                  30

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

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

Asp Arg Phe Thr 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 Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105                 110
```

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly
        115                 120                 125

Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe
    130                 135                 140

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

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

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

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

Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp
    210                 215                 220

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

Arg Gly Glu Cys
```

<210> 230
<211> 702
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 8B5-CB3.1-VEPKSC

<400> 230

```
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga aagagtcagt     60

ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca    120

gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa    180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct    240

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct    300

gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt ccaactgcag    360

cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct    420

ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt    480

gaatggattg gtatggttga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag    540

gacaaggcca cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc    600

ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta ctggggtcaa    660

ggaacctcag tcaccgtctc ctcagttgag cccaaatctt gt                       702
```

<210> 231
<211> 234
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 8B5-CB3.1-VEPKSC

<400> 231

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Leu Ala Ala Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys
225                 230
```

<210> 232
<211> 726
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CB3.1-8B5-FNRGEC

<400> 232

gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc 60

atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgtt caacagggga 720

gagtgt 726

<210> 233
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CB3.1-8B5-FNRGEC

<400> 233

```
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Asn Ile Gly
1               5                  10                  15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
            20                  25                  30

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

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

Asp Arg Phe Thr 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 Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105                 110
```

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly
        115                 120                 125

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

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

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

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

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

Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

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

Glu Cys
```

<210> 234
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC

<400> 234

gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga aagagtcagt 60

ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 120

gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct 240

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt ccaactgcag 360

cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct 420

ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt 480

gaatggattg gtatggttga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540

gacaaggcca cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc 600

ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta ctggggtcaa 660

ggaacctcag tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

<210> 235
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC

<400> 235

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Leu Ala Ala Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230
```

<210> 236
<211> 720
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CB3.1-8B5-LGGC

<400> 236

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc     60

atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg    120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac    180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc    240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg    300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc    360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc    420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct    480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca    540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt    600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct    660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc    720
```

<210> 237
<211> 240
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CB3.1-8B5-LGGC

<400> 237

```
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Asn Ile Gly
1               5                  10                  15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
            20                  25                  30

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

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

Asp Arg Phe Thr 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 Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105                 110
```

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly
        115                 120                 125

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

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

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

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

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

Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 238
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh628F

<400> 238
ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtc caactgcagc agcctgg 47

<210> 239
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh629R

<400> 239
tttgaattct aacaagattt gggctcaact gaggagacgg tgactgagg 49

<210> 240
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh630R

<400> 240
gcctccgcct ccggatccgc ctcctttcag ctccagcttg gtccc 45

<210> 241
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador Lgh631F

<400> 241
ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg aagcttgagg agtctgg 47

<210> 242
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh640R

<400> 242
tttgaattct aacactctcc cctgttgaac gaggagactg tgagagtgg 49

<210> 243
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh644R

<400> 243
tttgtcgtca tcatcgtctt tgtagtcgga gtggacacct gtggagag 48

<210> 244
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh646R

<400> 244
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgactg ag 42

<210> 245
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh647F

<400> 245
caaagacgat gatgacgaca aagacattca gatgacacag tctcc 45

<210> 246
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh648R

<400> 246
tttgaattct agcagcctcc cagcgaggag actgtgagag tgg 43

<210> 247
<211> 1044
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2.4G2-3G8-hKappa

<400> 247

```
gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat cttgctgcct ctcctggaga aagtgtttcc     60
atcaattgca aggcaagtga gagcattagc aagtatttag cctggtatct acagaaacct    120
gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg    180
aggttcagtg gcagtggatc tggtacagat ttcactctca ccatcagaag cctggagcct    240
gaagattttg gactctatta ctgtcaacag cattatgaat atccagccac gttcggttct    300
gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt taccctgaaa    360
gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc cagaccctca gtctgacttg ttctttctct    420
gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag    480
ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg    540
aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc    600
agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt    660
gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctcac tgggaggctg cggcggaggg    720
agccgtacgg tggctgcacc atcggtcttc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa    780
tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta    840
cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag    900
gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa agcagactac    960
gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca   1020
aagagcttca acaggggaga gtgt                                          1044
```

<210> 248
<211> 348
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 2.4G2-3G8-hKappa

<400> 248

```
Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Asn Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1               5                  10                  15
```

```
Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu Leu Met
        35                  40                  45

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Ala
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
                245                 250                 255

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
            260                 265                 270

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
        275                 280                 285

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
    290                 295                 300

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
305                 310                 315                 320

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
                325                 330                 335
```

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
340 345

<210> 249
<211> 1734
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 3G8-2.4G2-hG1

<400> 249

```
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc     60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac    120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct    180
gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat    240
cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac    300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag    360
gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg    420
tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca    480
acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga    540
gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg    600
caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg    660
ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca    720
ctgggaggct gcggcggagg gagcgcctcc accaagggcc catcggtctt ccccctggca    780
ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac    840
ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc    900
ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc    960
tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc   1020
aaggtggaca agagagttga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc   1080
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac   1140
accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa   1200
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca   1260
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg   1320
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca   1380
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac   1440

accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc   1500
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac   1560
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag   1620
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat   1680
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa          1734
```

<210> 250
<211> 578

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 3G8-2.4G2-hG1

<400> 250

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
    50                  55                  60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65                  70                  75                  80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
                165                 170                 175

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

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

```
Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
    210                 215                 220

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
            260                 265                 270

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
        275                 280                 285

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
    290                 295                 300

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
305                 310                 315                 320

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
                325                 330                 335

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
            340                 345                 350

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
        355                 360                 365

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
    370                 375                 380

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
385                 390                 395                 400

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
                405                 410                 415

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
            420                 425                 430

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
        435                 440                 445

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
    450                 455                 460

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
465                 470                 475                 480

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
                485                 490                 495

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
            500                 505                 510

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
        515                 520                 525
```

```
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
    530                 535                 540

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
545                 550                 555                 560

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                565                 570                 575

Gly Lys
```

<210> 251
<211> 720
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD79VL-CD32BVH

<400> 251

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc     60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg    120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac    180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc    240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg    300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc    360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc    420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct    480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca    540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt    600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct    660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc    720
```

<210> 252
<211> 240
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD79VL-CD32BVH

<400> 252

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

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

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

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

Gly Gly Gly Ser Gly 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 Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

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

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

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

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 253
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-1

<400> 253

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc     60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca    120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc    180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct    240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg    300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg    360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct    420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt    480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag    540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc    600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa    660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc                              696
```

<210> 254
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-1

<400> 254

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Met Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val

        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230
```

<210> 255
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-2

<400> 255

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc     60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca    120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc    180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct    240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg    300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg    360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct    420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt    480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag    540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc    600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa    660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc                              696
```

<210> 256
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-2

<400> 256

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
        35                  40                  45
```

```
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230
```

<210> 257
<211> 720
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC

<400> 257

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc     60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg    120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac    180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc    240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg    300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc    360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc    420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct    480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca    540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt    600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct    660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc    720
```

<210> 258
<211> 240
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC

<400> 258

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

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

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

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

Gly Gly Gly Ser Gly 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 Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

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

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

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

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 259
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H8B5VL-hHBCRCVH M48I-LGGC

<400> 259

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc     60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca    120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc    180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct    240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg    300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg    360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct    420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt    480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag    540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc    600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa    660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc                               696
```

<210> 260
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H8B5VL-HBCRCVH M48I-LGGC

<400> 260

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
```

```
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Met Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230
```

<210> 261
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh321F

<400> 261
cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

<210> 262
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh386R

<400> 262
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tggtc 45

<210> 263
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh784F

<400> 263
ggcggatccg gaggcggagg ccaggttcag ctggtgcag 39

<210> 264
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh785R

<400> 264
cctccggatc cgcctccttt gatctcaagc ttggtccc 38

<210> 265
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh786R

<400> 265
tttgaattct agcagcctcc caggctggag acggtcacca gg 42

<210> 266
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lgh787F

<400> 266
ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg cagcttgtgg agtc 44

<210> 267
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 267

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 268
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 268

Leu Glu Ile Lys
1

<210> 269

<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 269

Thr Val Ser Ser
1

<210> 270
<211> 343
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa

<400> 270

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

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

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

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

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
165 170 175

```
Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala
225                 230                 235                 240

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
                245                 250                 255

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
            260                 265                 270

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
        275                 280                 285

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
    290                 295                 300

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
305                 310                 315                 320

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
                325                 330                 335

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            340
```

<210> 271
<211> 1032
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa

<400> 271

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc     60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca    120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc    180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct    240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg    300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg    360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct    420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt    480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag    540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc    600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa    660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgcggcg gagggagccg aactgtggct    720

gcaccatcgg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct    780

gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat    840

aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc    900

acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc    960

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg   1020

ggagagtgtt ag                                                       1032
```

<210> 272
<211> 574
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1

<400> 272

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

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

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

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

Gly Gly Gly Ser Gly 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 Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

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

```
Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

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

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

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

Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
                245                 250                 255

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
            260                 265                 270

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
        275                 280                 285

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
    290                 295                 300

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
305                 310                 315                 320

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
                325                 330                 335

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
            340                 345                 350

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
        355                 360                 365

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
    370                 375                 380

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
385                 390                 395                 400

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
                405                 410                 415

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
            420                 425                 430

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
        435                 440                 445

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
    450                 455                 460

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
465                 470                 475                 480

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
                485                 490                 495
```

```
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
            500                 505                 510

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
        515                 520                 525

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
    530                 535                 540

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
545                 550                 555                 560

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                565                 570
```

<210> 273
<211> 1722
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1

<400> 273

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc 420

tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc 480

ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt 600

ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctccagcct gggaggctgc 720

ggcggaggga gcgcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag 780

agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 840

gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 900

ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 960

ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 1020

agagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 1080

ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 1140

tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1200

aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1260

gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1320

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1380

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1440

tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 1500

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1560

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1620

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1680

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1722

<210> 274

<211> 335
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa

<400> 274

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
    130                 135                 140
```

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

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
225                 230                 235                 240

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

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
            260                 265                 270

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
        275                 280                 285

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
    290                 295                 300

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
305                 310                 315                 320

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                325                 330                 335
```

<210> 275
<211> 1005
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa

<400> 275

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc     60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca    120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc    180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct    240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg    300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg    360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct    420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt    480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag    540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc    600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa    660

gggaccacgg tcctggagat caagcgaact gtggctgcac catcggtctt catcttcccg    720

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc    780

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc    840

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg    900

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag    960

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt                   1005
```

<210> 276
<211> 566
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1 = HBCRCVL R45N-h8B5VH_-hG1

<400> 276

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

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

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

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

Gly Gly Gly Ser Gly 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 Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
```

```
                165                 170                 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

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

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

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

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
                245                 250                 255

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
            260                 265                 270

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
        275                 280                 285

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
    290                 295                 300

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
305                 310                 315                 320

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
                325                 330                 335

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
            340                 345                 350

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        355                 360                 365

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    370                 375                 380

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
385                 390                 395                 400

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                405                 410                 415

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            420                 425                 430

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        435                 440                 445

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    450                 455                 460

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
465                 470                 475                 480

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
```

```
                485                 490                 495

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            500                 505                 510

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        515                 520                 525

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
    530                 535                 540

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
545                 550                 555                 560

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                565
```

<210> 277
<211> 1698
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1

<400> 277

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc     60
atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg    120
tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac    180
tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc    240
agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg    300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc    360
gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc    420
tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc    480
ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca    540
tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt    600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct    660
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctccagcgc ctccaccaag    720
ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc    780
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc    840
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc    900
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac    960
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac   1020

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc   1080
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc   1140
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc   1200
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt   1260
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc   1320
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg   1380
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac   1440
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg   1500
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac   1560
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac   1620
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc   1680
tccctgtctc cgggtaaa                                                1698
```

<210> 278
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 278

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 279
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 279

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met
1 5 10

<210> 280
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 280

Leu Glu Gly Glu Glu Gly
1 5

<210> 281
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 281

Leu Glu Gly Glu Glu Gly Cys
1 5

<210> 282
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 282

Leu Glu Ile Lys
1

<210> 283
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 283

Leu Gly Glu Glu Gly
1 5

<210> 284
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 284

Leu Gly Glu Glu Gly Cys
1 5

<210> 285
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 285

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 286
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 286

Leu Gly Lys Lys Gly
1 5

<210> 287
<211> 6

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 287

Leu Gly Lys Lys Gly Cys
1 5

<210> 288
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 288

Leu Lys Gly Lys Lys Gly
1 5

<210> 289
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 289

Leu Lys Gly Lys Lys Gly Cys
1 5

<210> 290
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 290

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met
1 5

<210> 291
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 291

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys
1 5

<210> 292
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 292

Thr Val Ser Ser
1

<210> 293
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 293

Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 294
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 294

Val Glu Pro Lys Ser Cys Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
1 5 10

<210> 295
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 295

Val Gln Val His Tyr Arg Met
1 5

<210> 296
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 296

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys
1 5

<210> 297
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 297

Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
1 5

<210> 298
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 298

Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys
1 5

<210> 299
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador de bucle E

<400> 299

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

<210> 300
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador de bucle K

<400> 300

```
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
```

<210> 301
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 301

```
Gly Gly Gly Asn Ser
1               5
```

<210> 302
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región variable de la cadena ligera de YA2B6

<400> 302

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                   10                  15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 303
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región variable de la cadena pesada de YA2B6

<400> 303

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 304
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio de unión a albúmina

<400> 304

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

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

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

<210> 305
<211> 279
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-bucle K-GGGNS

<400> 305

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

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

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

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

Lys Glu Gly Gly Gly Asn Ser
        275
```

<210> 306
<211> 837
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-bucle K-GGGNS

<400> 306

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga agatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggcgg cggaggccag 360

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 420

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct 480

ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat 540

aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg 600

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat 660

tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctcc 720

ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag 780

aaggtcgccg cacttaagga aaaggtcgca gccctgaaag agggcggcgg gaattct 837

<210> 307
<211> 318
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-bucle E-GGGNS-ABD

<400> 307

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

```
Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

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

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

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

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

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu
225                 230                 235                 240

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

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asn Ser
            260                 265                 270

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
        275                 280                 285

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
    290                 295                 300

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
305                 310                 315
```

<210> 308
<211> 954
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-bucle E-GGGNS-ABD

<400> 308

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt taccctgaga 360

gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct 420

gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag 480

gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg 540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc 600

aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt 660

gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctccg gaggatgtgg cggtggagaa 720

gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag 780

gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg aattctctgg ccgaagcaaa agtgctggcc 840

aaccgcgaac tggataaata tggcgtgagc gattattata agaacctgat taacaacgca 900

aagaccgtgg aaggcgtgaa agcactgatt gatgaaattc tggccgccct gcct 954

<210> 309
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 309

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 310
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 310

Val Pro Ser Met Gly Ser Ser Ser
1 5

<210> 311
<211> 383
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 311

```
Met Gly Leu Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ala Gly Ile Phe Pro Phe
1               5                  10                  15

Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu
            20                  25                  30

Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Thr Glu
        35                  40                  45

Val His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys
    50                  55                  60

Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys
65                  70                  75                  80

Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu
                85                  90                  95

Arg Met Thr Leu Ala His Ile Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser
            100                 105                 110

Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg
        115                 120                 125

Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn
    130                 135                 140

Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr
145                 150                 155                 160

Leu Ala Met Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr
                165                 170                 175

Lys Thr His Tyr His Ala Met His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg
            180                 185                 190

Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met
        195                 200                 205

Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr
    210                 215                 220

Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn Ile Thr Leu Ser Trp Arg
225                 230                 235                 240

Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val
                245                 250                 255

Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile
```

```
            260                 265                 270

Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly
        275                 280                 285

Asn His Ser Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val Leu Val Leu Gln
    290                 295                 300

Ser His Trp Gln Thr Phe His Val Ser Ala Val Ala Ala Ala Ala Ile
305                 310                 315                 320

Phe Val Ile Ile Ile Phe Tyr Val Arg Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser
                325                 330                 335

Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His
            340                 345                 350

Pro Val Gly Thr Ser Asp His Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln
        355                 360                 365

Pro Leu Met Ser Asp Leu Gly Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala
    370                 375                 380
```

<210> 312
<211> 305
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 312

```
Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Met Val Leu Ser Gln Asp Gly Ser
1               5                  10                  15

Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu Gly His Leu Asp Gly Gln Pro Phe
            20                  25                  30

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

Ala Glu Asp Val Leu Gly Ala Lys Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu Asp
    50                  55                  60

Leu Thr Glu Asn Gly Gln Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His Ile Lys
65                  70                  75                  80

Asp Gln Lys Gly Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu
                85                  90                  95

Ile His Glu Asp Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr Asp
            100                 105                 110

Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr Val
        115                 120                 125

Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Thr Asn Phe
    130                 135                 140

Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala Met Gln
145                 150                 155                 160
```

```
Ala Asp Cys Leu Gln Lys Leu Gln Leu Pro Pro Met Val Asn Val Ile
                165                 170                 175

Cys Ser Glu Val Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser
            180                 185                 190

Ser Phe Tyr Pro Arg Asn Ile Thr Leu Thr Trp Arg Gln Asp Gly Val
        195                 200                 205

Ser Leu Ser His Asn Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly
    210                 215                 220

Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Arg Gln Gly Glu
225                 230                 235                 240

Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Gly Thr
                245                 250                 255

His Pro Val Pro Ser Gly Lys Ala Leu Val Leu Gln Ser Gln Arg Thr
            260                 265                 270

Asp Phe Pro Tyr Val Ser Ala Ala Met Pro Cys Phe Val Ile Ile Ile
        275                 280                 285

Ile Leu Cys Val Pro Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser Ala Ala Glu Gly
    290                 295                 300

Pro
305
```

<210> 313
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 313

```
Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1               5
```

<210> 314
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 314

```
Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
1               5
```

<210> 315

<211> 241
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TCRVL-HER2VH

<400> 315

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
            20                  25                  30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
                85                  90                  95

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

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

Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
    130                 135                 140

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
145                 150                 155                 160

Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro
                165                 170                 175

Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
            180                 185                 190

Ala Tyr Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
        195                 200                 205

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
    210                 215                 220

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg Gly Glu
225                 230                 235                 240

Cys
```

<210> 316
<211> 723
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TCRVL-HER2VH

<400> 316

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg 120

aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg 180

ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa 240

gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg 300

accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag 360

tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc 420

ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa 480

tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac 540

aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg 600

acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct 660

atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct ccggattcaa caggggagag 720

tgt 723

<210> 317
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HER2VL-TCRVH

<400> 317

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
            20                  25                  30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110


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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe
    130                 135                 140

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn
                165                 170                 175

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr
    210                 215                 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Val Glu Pro Lys
225                 230                 235                 240

Ser Cys
```

<210> 318
<211> 726
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HER2VL-TCRVH

<400> 318

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc 60

atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca 120

ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat 180

cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg 300

ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc 420

ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa 540

ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc 600

ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac 660

gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagt tgagcccaaa 720

tcttgt 726

<210> 319
<211> 273
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TCRVL-HER2VH-bucle E

<400> 319

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
            20                  25                  30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
                85                  90                  95

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

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

Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
    130                 135                 140

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
145                 150                 155                 160

Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro
                165                 170                 175

Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
            180                 185                 190

Ala Tyr Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
        195                 200                 205

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
    210                 215                 220

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

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

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

Ser
```

<210> 320
<211> 819
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TCRVL-HER2VH-bucle E

<400> 320

```
Gly Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys Ala Cys
1               5                  10                  15

Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr
            20                  25                  30

Gly Thr Cys Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly
        35                  40                  45

Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Thr
    50                  55                  60

Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Thr Cys
65                  70                  75                  80

Ala Ala Gly Thr Gly Thr Ala Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Thr Gly
                85                  90                  95

Cys Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala
            100                 105                 110

Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Cys
        115                 120                 125

Thr Ala Ala Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Ala Thr
    130                 135                 140

Gly Ala Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly
145                 150                 155                 160

Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Ala Thr Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Thr
            180                 185                 190

Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala Ala Thr
        195                 200                 205

Thr Thr Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Gly
    210                 215                 220

Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala
225                 230                 235                 240
```

```
Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr
                245                 250                 255

Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Gly
            260                 265                 270

Thr Ala Gly Thr Ala Ala Cys Cys Cys Gly Cys Thr Cys Ala Cys Gly
        275                 280                 285

Thr Thr Thr Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala
    290                 295                 300

Ala Gly Cys Thr Thr Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala Ala Gly Gly
305                 310                 315                 320

Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys
                325                 330                 335

Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys
            340                 345                 350

Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys
        355                 360                 365

Ala Gly Ala Gly Cys Thr Thr Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Ala
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Gly Cys Cys Thr Cys Ala Cys Thr Cys Ala Ala Gly Thr
385                 390                 395                 400

Thr Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys
                405                 410                 415

Thr Gly Gly Cys Thr Thr Cys Ala Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala
            420                 425                 430

Gly Ala Cys Ala Cys Cys Thr Ala Thr Ala Thr Ala Cys Ala Cys Thr
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Gly Gly Cys Cys
    450                 455                 460

Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala
465                 470                 475                 480

Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Ala Ala Gly Gly Ala Thr Thr Thr
                485                 490                 495

Ala Thr Cys Cys Thr Ala Cys Gly Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala
            500                 505                 510

Thr Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys Gly
        515                 520                 525

Ala Ala Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Gly
    530                 535                 540

Cys Cys Ala Cys Thr Ala Thr Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala
545                 550                 555                 560
```

```
Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Cys Ala
                565                 570                 575

Gly Cys Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala
            580                 585                 590

Gly Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala
        595                 600                 605

Gly Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Gly Thr Cys Thr Ala Thr
    610                 615                 620

Thr Ala Thr Thr Gly Thr Thr Cys Thr Ala Gly Ala Thr Gly Gly Gly
625                 630                 635                 640

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Ala
                645                 650                 655

Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly
            660                 665                 670

Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Cys Gly Gly
        675                 680                 685

Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly Ala Gly Cys Thr Cys Cys Gly Gly
    690                 695                 700

Ala Gly Gly Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala
705                 710                 715                 720

Gly Ala Ala Gly Thr Gly Gly Cys Cys Gly Cys Ala Cys Thr Gly Gly
                725                 730                 735

Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Thr Thr Gly Cys Thr Gly Cys
            740                 745                 750

Thr Thr Thr Gly Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Thr Cys
        755                 760                 765

Gly Cys Thr Gly Cys Ala Cys Thr Thr Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly
    770                 775                 780

Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala
785                 790                 795                 800

Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ala Ala Thr
                805                 810                 815

Thr Cys Thr
```

<210> 321
<211> 274
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HER2VL-TCRVH-bucle K

<400> 321

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
            20                  25                  30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe
    130                 135                 140

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn
                165                 170                 175

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr
    210                 215                 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Lys Val Ala Ala Leu 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 Gly Gly Gly
            260                 265                 270

Asn Ser
```

<210> 322
<211> 822
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HER2VL-TCRVH-bucle K

<400> 322

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc 60

atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca 120

ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat 180

cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg 300

ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc 420

ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa 540

ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc 600

ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac 660

gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagg atgtggcggt 720

ggaaaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt 780

aaggaaaagg tcgcagccct gaaagagggc ggcgggaatt ct 822

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de diacuerpo que comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, estando las cadenas polipeptídicas unidas covalentemente entre sí, en donde:

I. la primera cadena de polipéptido comprende: (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un epítopo (1), (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un epítopo (2) y (iii) un tercer dominio que comprende:

(1) un dominio Fc; o
(2) un dominio bisagra; o
(3) una región constante de cadena ligera (CL);

estando el primer dominio y el segundo dominio unidos covalentemente, de tal forma que el primer dominio y el segundo dominio no se asocian entre sí para formar un sitio de unión a epítopo (1) o un sitio de unión a epítopo (2);

II. la segunda cadena polipeptídica comprende: (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2) específica para el epítopo (2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) específica para el epítopo (1) y (iii) un sexto dominio que comprende:

(1) un dominio Fc, donde el tercer dominio comprende un dominio Fc; o
(2) una porción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO: 23), donde el tercer dominio comprende un dominio Fc o un dominio bisagra; o
(3) una región constante 1 (CH1) de cadena pesada, una región bisagra, una región constante 2 (CH2) de cadena pesada y una región constante 3 (CH3) de cadena pesada, donde el tercer dominio comprende una región constante de cadena ligera (CL);
estando el cuarto dominio y el quinto dominio unidos covalentemente, de tal forma que el cuarto dominio y el quinto dominio no se asocian entre sí para formar un sitio de unión a epítopo (1) o un sitio de unión a epítopo (2);

en donde el primer dominio y el quinto dominio se asocian entre sí para formar un sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al epítopo (1);
en donde el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian entre sí para formar un sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al epítopo (2); y
en donde:

(1) los dominios segundo y tercero; y/o
(2) los dominios quinto y sexto;

están unidos entre sí mediante un enlazador polipeptídico intermedio que consiste en una secuencia que se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:278, 280, 281, 283, 284, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 293, 295 y 297.

2. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en donde el tercer dominio es un dominio Fc y el sexto dominio es un dominio Fc.

3. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 2, en donde el tercer dominio comprende además un dominio bisagra.

4. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en donde el tercer dominio es un dominio Fc y el sexto dominio comprende una porción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO: 23).

5. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en donde el tercer dominio es un dominio bisagra y el sexto dominio comprende una porción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO: 23).

6. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en donde el tercer dominio comprende una región constante de cadena ligera (CL) y el sexto dominio comprende una región constante 1 (CH1) de cadena pesada, una región bisagra, una región constante 2 (CH2) de cadena pesada y una región constante 3 (CH3) de cadena pesada.

7. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 6, en donde la molécula comprende adicionalmente una tercera cadena polipeptídica y una cuarta cadena polipeptídica, estando las cadenas polipeptídicas adicionales unidas covalentemente entre sí, en donde:

III. la tercera cadena polipeptídica comprende: (i) un séptimo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una tercera inmunoglobulina (VL3) específica para un epítopo (3); (ii) un octavo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una cuarta inmunoglobulina (VH4) específica para un epítopo (4); y (iii) un noveno dominio que comprende una región constante de cadena ligera (CL); estando el séptimo dominio y el octavo dominio unidos covalentemente, de tal forma que el séptimo dominio y el octavo dominio no se asocian entre sí para formar un sitio de unión a epítopo (3) o un sitio de unión a epítopo (4);

IV. la cuarta cadena de polipéptido comprende: (i) un décimo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la cuarta inmunoglobulina (VL4) específica para el epítopo (4); (ii) un undécimo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la tercera inmunoglobulina (VH3) específica para el epítopo (3); y (iii) un duodécimo dominio que comprende una región constante 1 de cadena pesada (CH1);

estando el décimo dominio y el undécimo dominio unidos covalentemente, de tal forma que el décimo dominio y el undécimo dominio no se asocian entre sí para formar un sitio de unión a epítopo (3) o un sitio de unión a epítopo (4);
en donde el séptimo dominio y el undécimo dominio se asocian entre sí para formar un sitio de unión (VL3)(VH3) que se une al epítopo (3);
en donde el octavo dominio y el décimo dominio se asocian entre sí para formar un sitio de unión (VL4)(VH4) que se une al epítopo (4);
en donde el noveno dominio y el duodécimo dominio se asocian entre sí mediante un enlace disulfuro para formar un CH1;
en donde la región bisagra, la región constante 2 (CH2) de cadena pesada y la región constante 3 (CH3) de cadena pesada de las cadenas de polipéptido segunda y cuarta se asocian entre sí para formar una región Fc;
y
en donde:

(1) los dominios octavo y noveno; y/o

(2) los dominios undécimo y duodécimo;

están unidos entre sí mediante un enlazador polipeptídico intermedio que consiste en una secuencia que se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:278, 280, 281, 283, 284, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 293, 295 y 297.

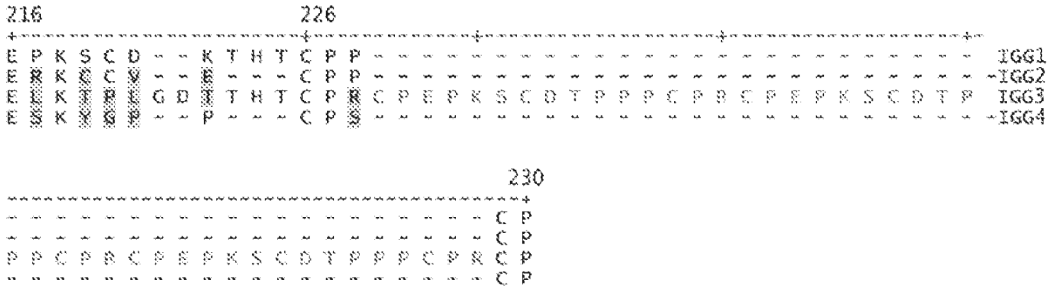


FIG. 1A

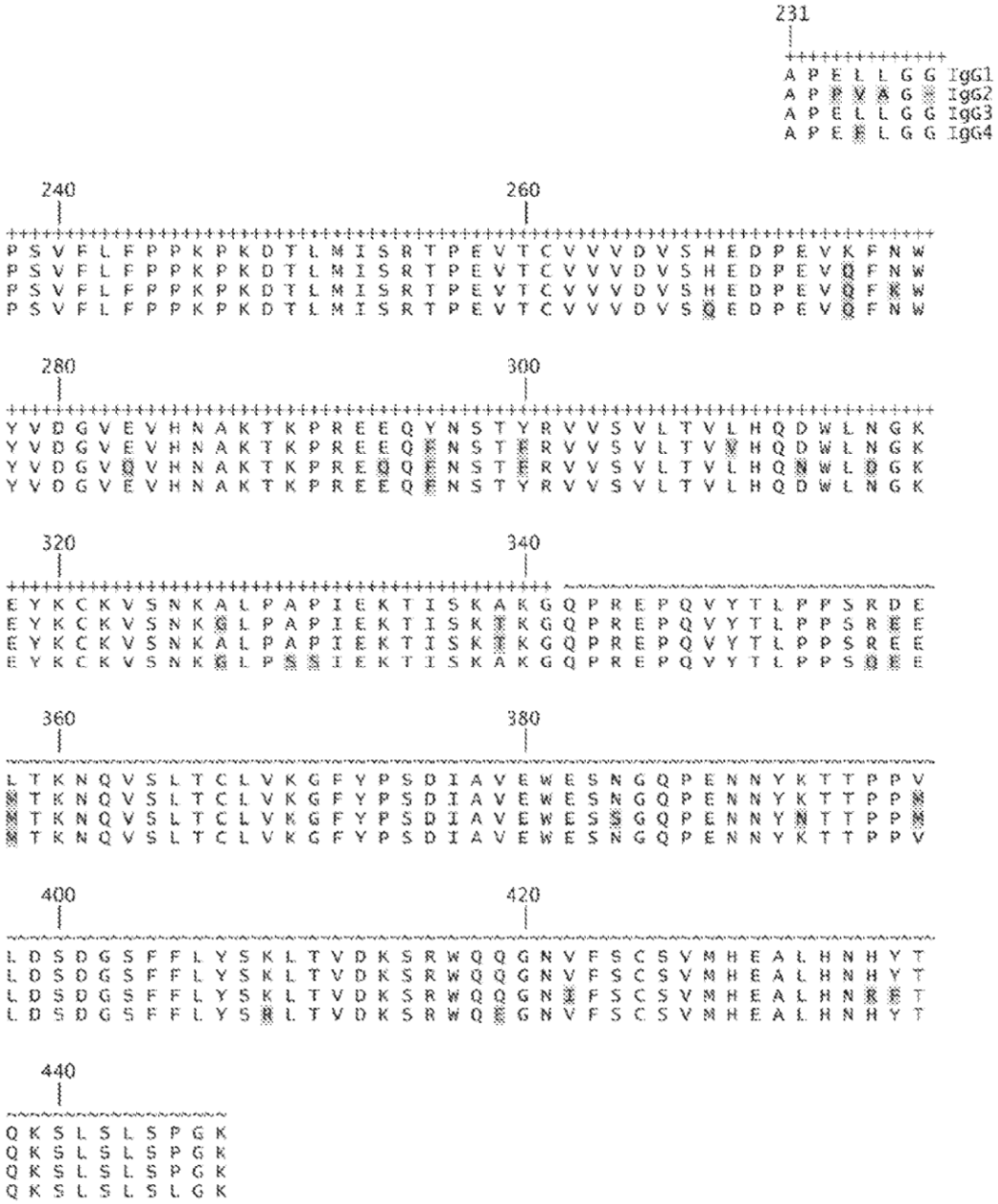

231
A P E L L G G IgG1
A P P V A G IgG2
A P E L L G G IgG3
A P E P L G G IgG4
240
260
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F K W
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W
280
300
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K
Y V D G V Q V H N A K T K P R E Q Q F N S T F R V V S V L T V L H Q N W L D G K
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
320
340
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E
360
380
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S S G Q P E N N Y N T T P P M
S T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
400
420
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N I F S C S V M H E A L H N R E T
L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
440
Q K S L S L S P G K
Q K S L S L S P G K
Q K S L S L S P G K
Q K S L S L S L G K

FIG. 1B

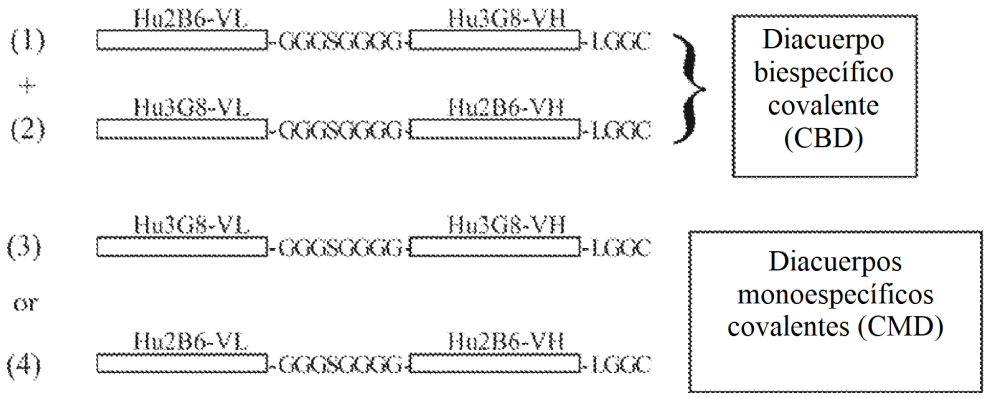

(1)
Hu2B6-VL
-GGGSGGGG-
Hu3G8-VH
-LGGC
+
(2)
Hu3G8-VL
-GGGSGGGG-
Hu2B6-VH
-LGGC
Diacuerpo biespecífico covalente (CBD)
(3)
Hu3G8-VL
-GGGSGGGG-
Hu3G8-VH
-LGGC
or
(4)
Hu2B6-VL
-GGGSGGGG-
Hu2B6-VH
-LGGC
Diacuerpos monoespecíficos covalentes (CMD)

FIG. 2

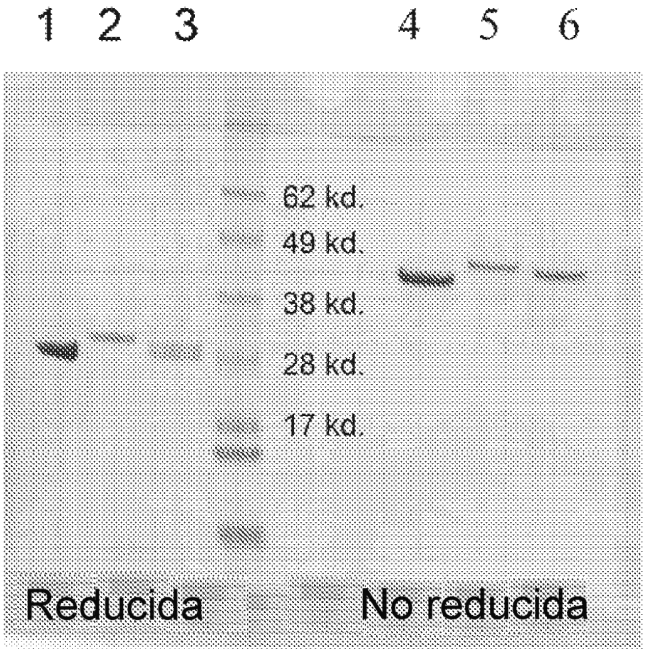


FIG. 3

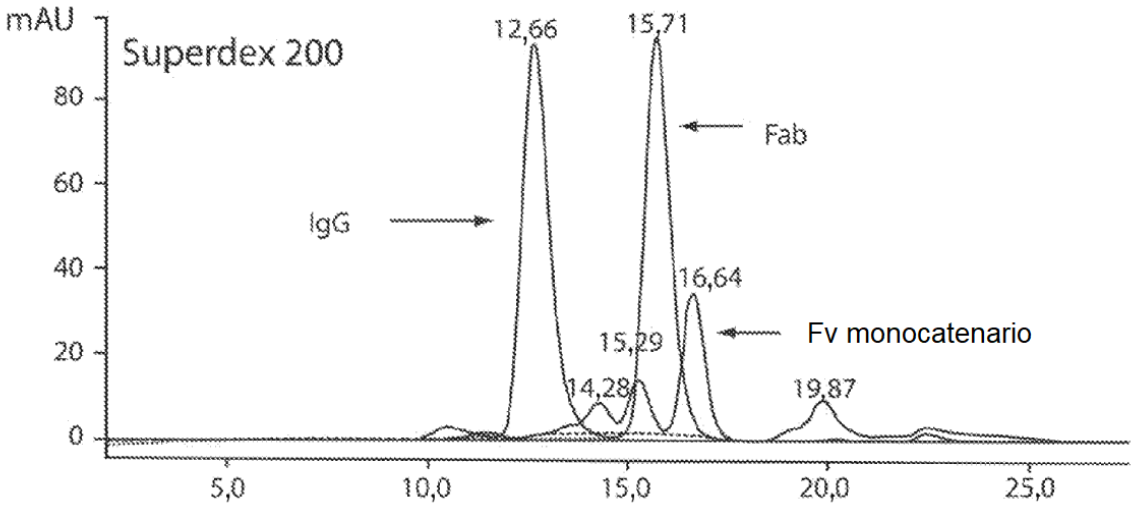

mAU
Superdex 200
12,66
15,71
Fab
IgG
16,64
15,29
Fv monocatenario
14,28
19,87
80
60
40
20
0
5,0
10,0
15,0
20,0
25,0

FIG. 4A

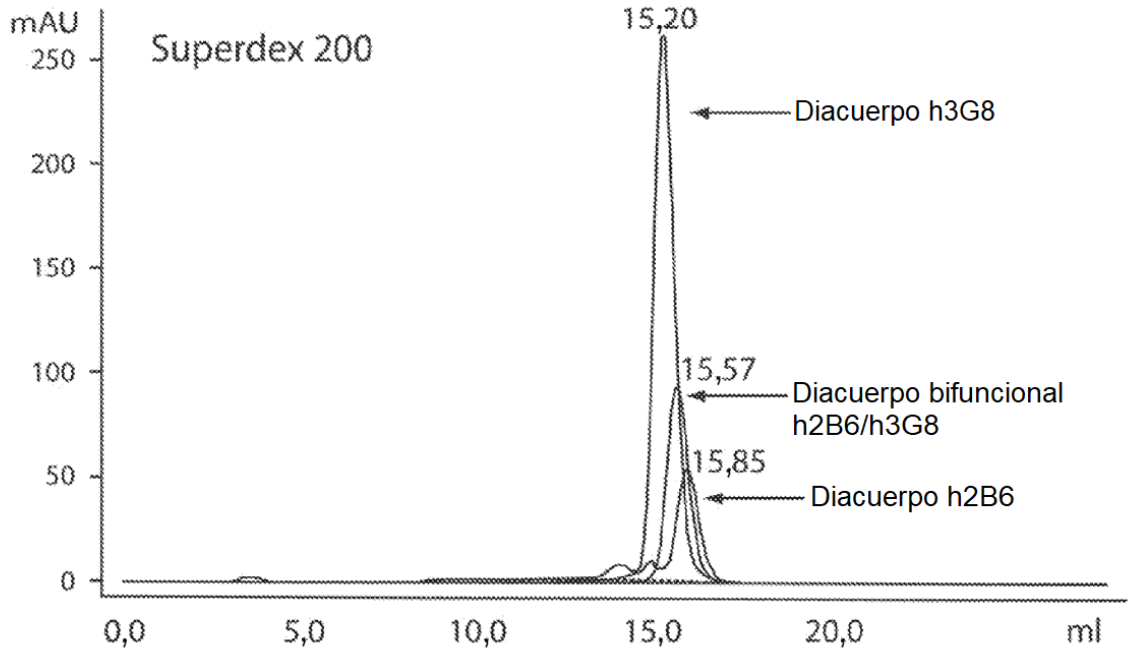

mAU
Superdex 200
15,20
Diacuerpo h3G8
15,57
Diacuerpo bifuncional
h2B6/h3G8
15,85
Diacuerpo h2B6
250
200
150
100
50
0
0,0
5,0
10,0
15,0
20,0
ml

FIG. 4B

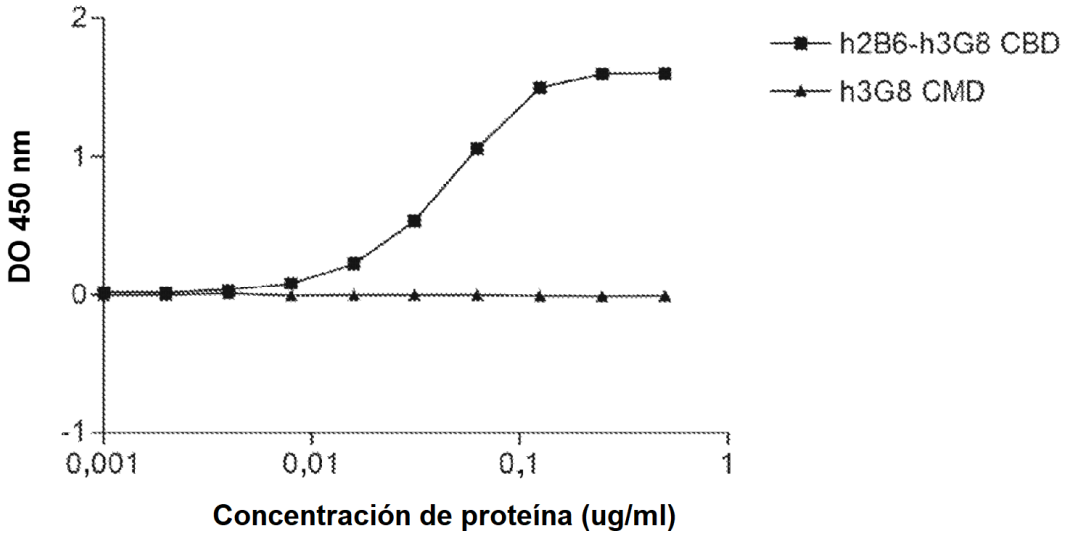

2
1
0
-1
DO 450 nm
0,001
0,01
0,1
1
Concentración de proteína (ug/ml)
h2B6-h3G8 CBD
h3G8 CMD

FIG. 5

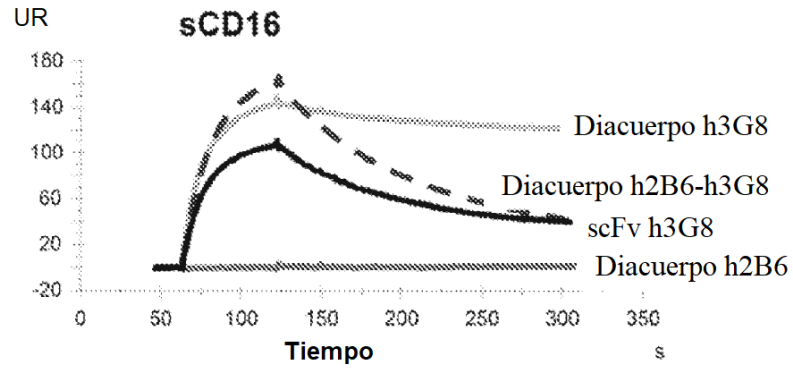


FIG. 6A

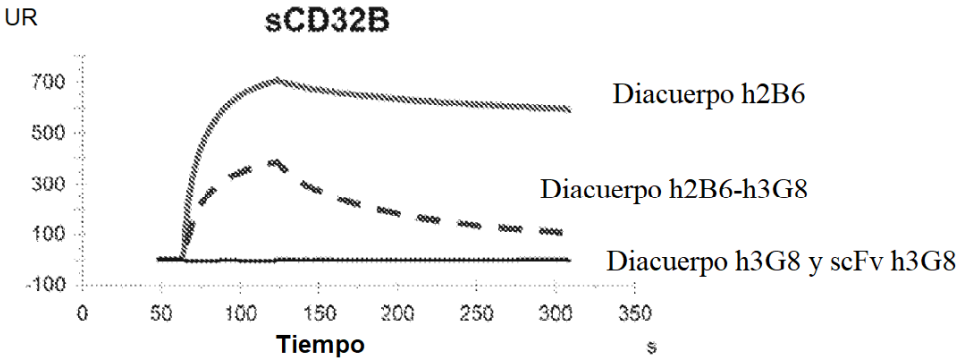


FIG. 6B

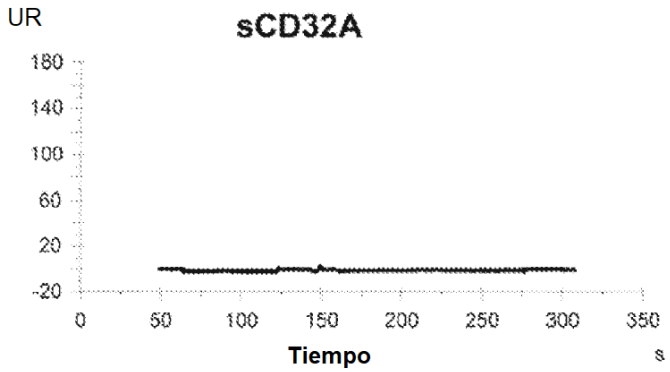


FIG. 6C

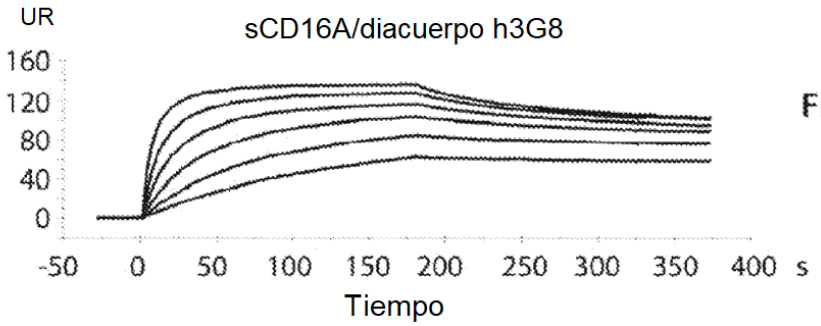


FIG. 7A

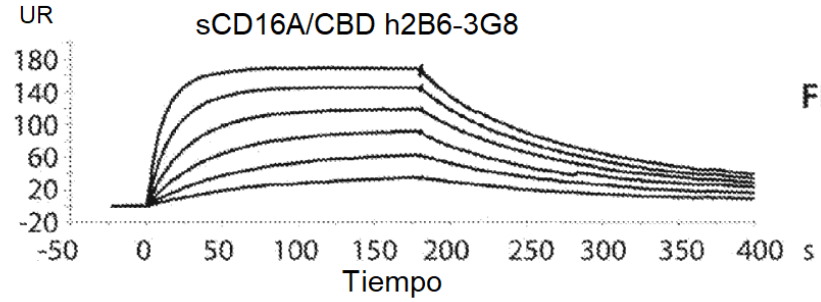


FIG. 7B

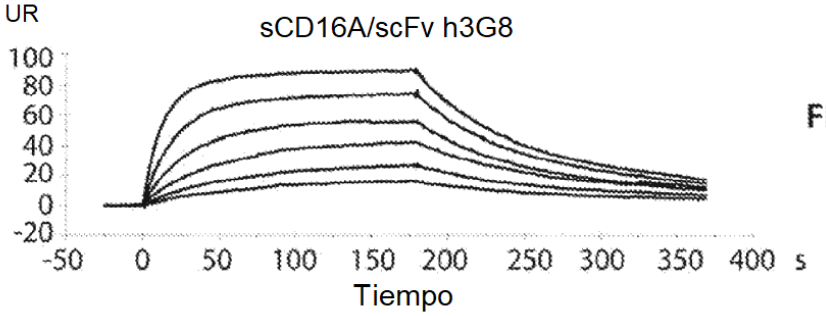


FIG. 7C

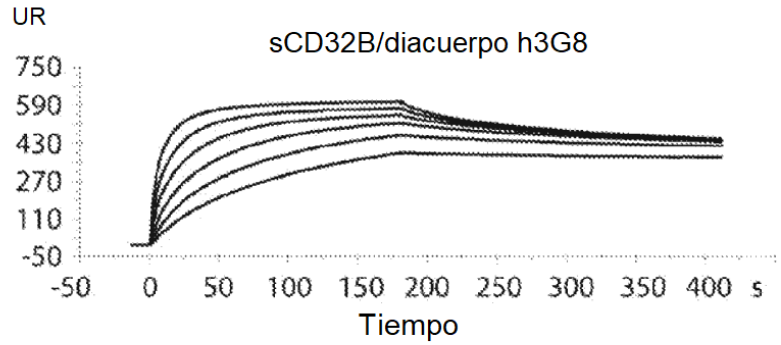


FIG. 7D

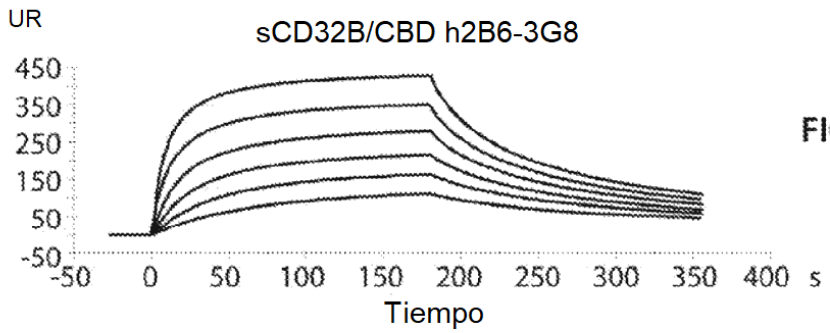


FIG. 7E

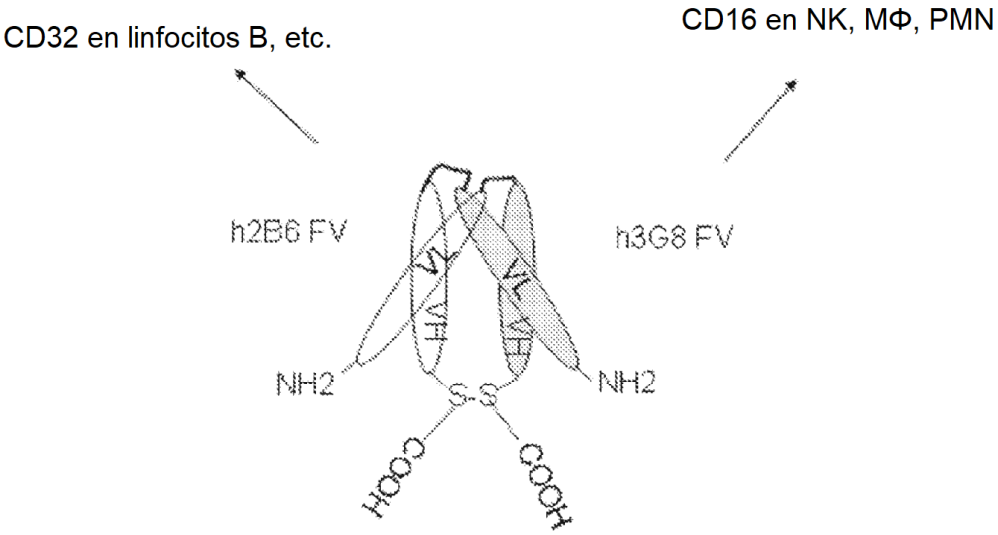

CD32 en linfocitos B, etc.
CD16 en NK, MΦ, PMN
h2B6 FV
h3G8 FV
VH
VL
VL
VH
NH2
NH2
S-S
COOH
COOH

FIG. 8

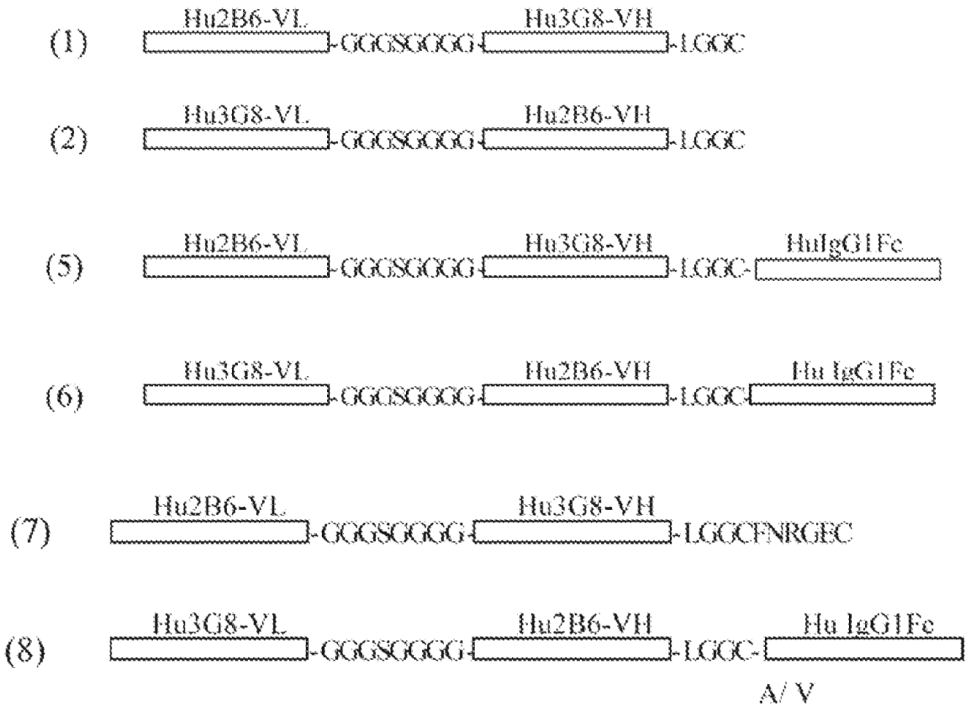

(1)
Hu2B6-VL
-GGGSGGGG-
Hu3G8-VH
-LGGC
(2)
Hu3G8-VL
-GGGSGGGG-
Hu2B6-VH
-LGGC
(5)
Hu2B6-VL
-GGGSGGGG-
Hu3G8-VH
-LGGC-
HuIgG1Fc
(6)
Hu3G8-VL
-GGGSGGGG-
Hu2B6-VH
-LGGC
Hu IgG1Fc
(7)
Hu2B6-VL
-GGGSGGGG-
Hu3G8-VH
-LGGCFNRGEC
(8)
Hu3G8-VL
-GGGSGGGG-
Hu2B6-VH
-LGGC-
Hu IgG1Fc
A/ V

FIG. 9

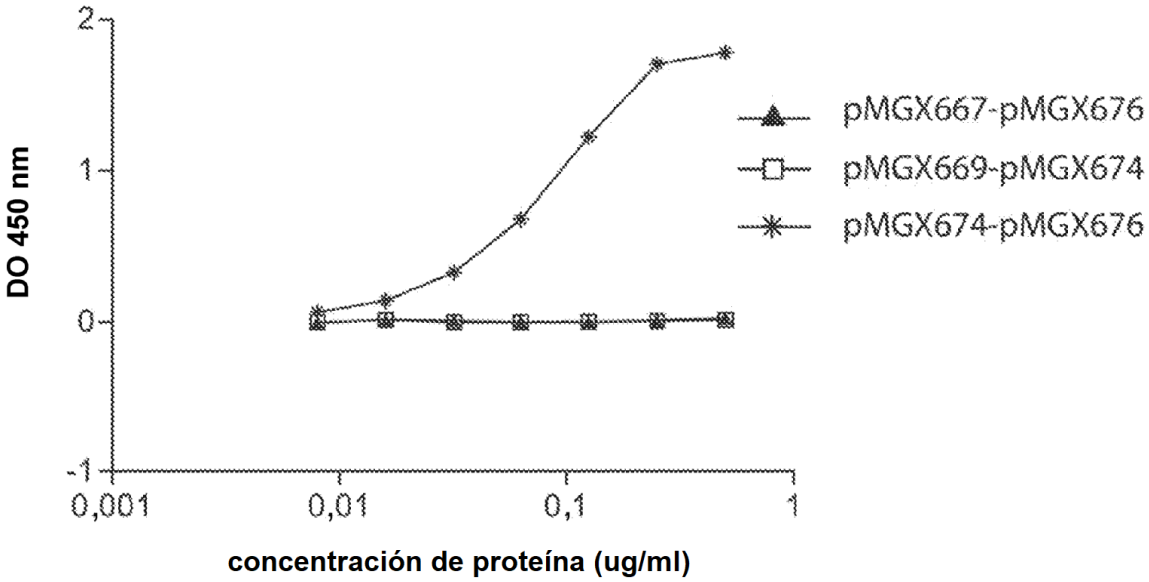

DO 450 nm
2
1
0
-1
0,001
0,01
0,1
1
concentración de proteína (ug/ml)
pMGX667-pMGX676
pMGX669-pMGX674
pMGX674-pMGX676

FIG. 10

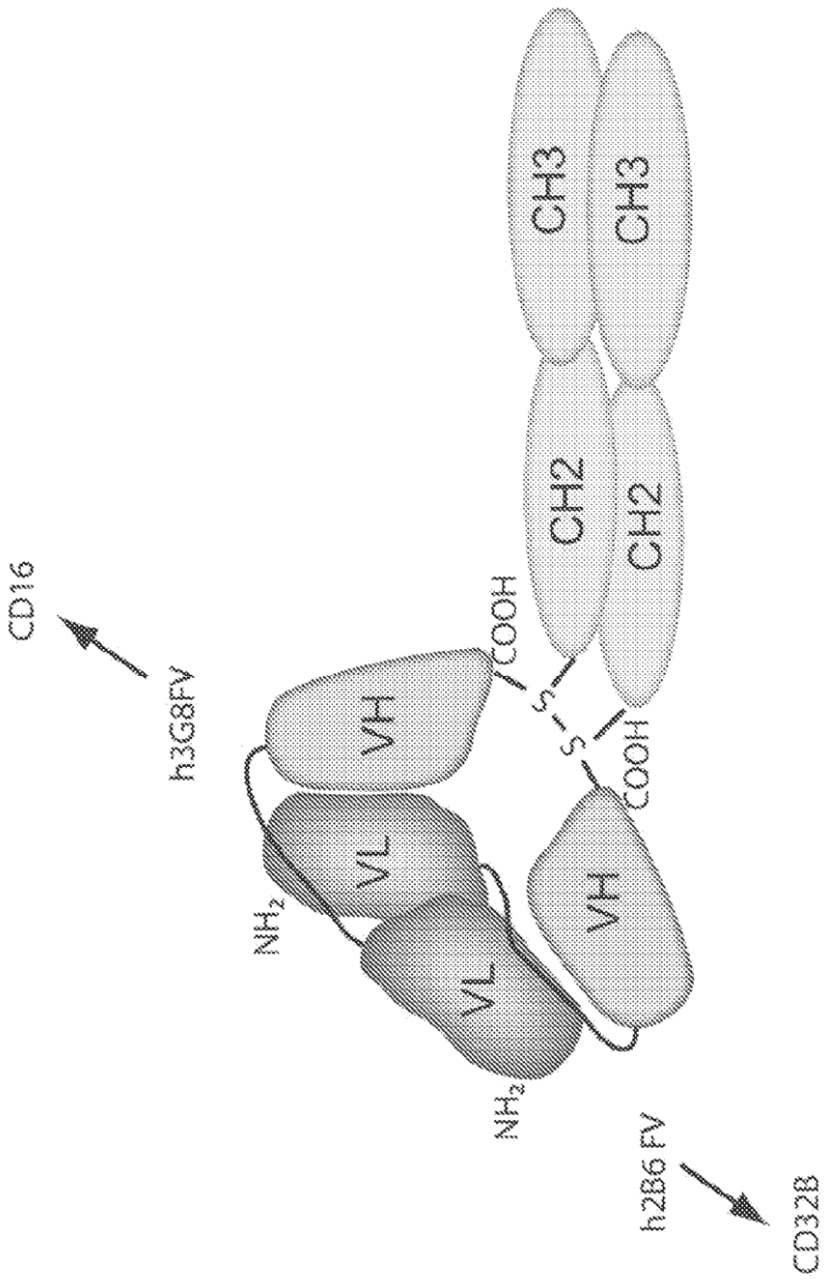

CD16
h3G8FV
VH
VL
VL
VH
NH2
NH2
COOH
COOH
S
S
CH2
CH2
CH3
CH3
h2B6 FV
CD32B

FIG. 11

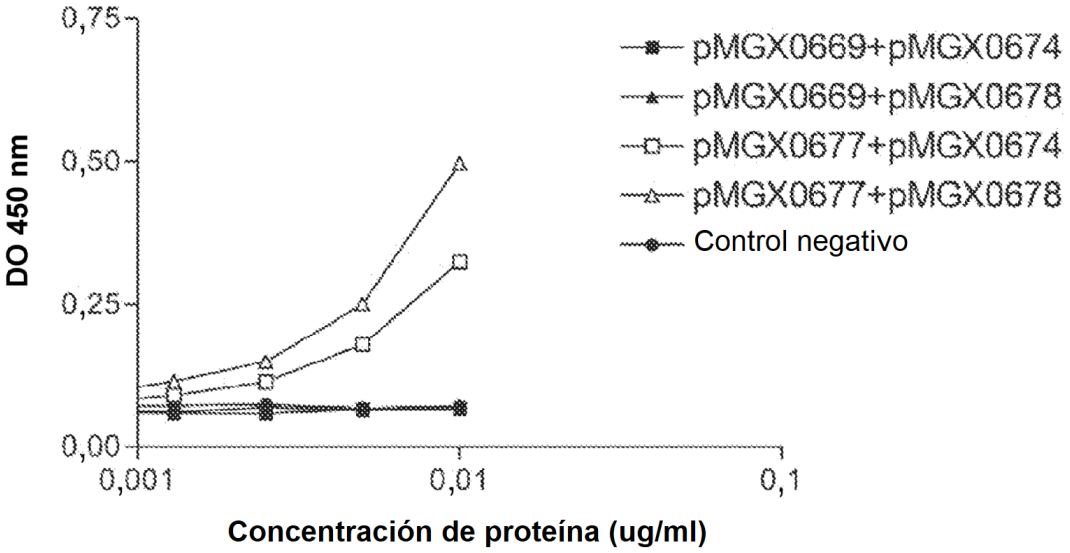

0,75
0,50
0,25
0,00
DO 450 nm
0,001
0,01
0,1
Concentración de proteína (ug/ml)
pMGX0669+pMGX0674
pMGX0669+pMGX0678
pMGX0677+pMGX0674
pMGX0677+pMGX0678
Control negativo

FIG. 12

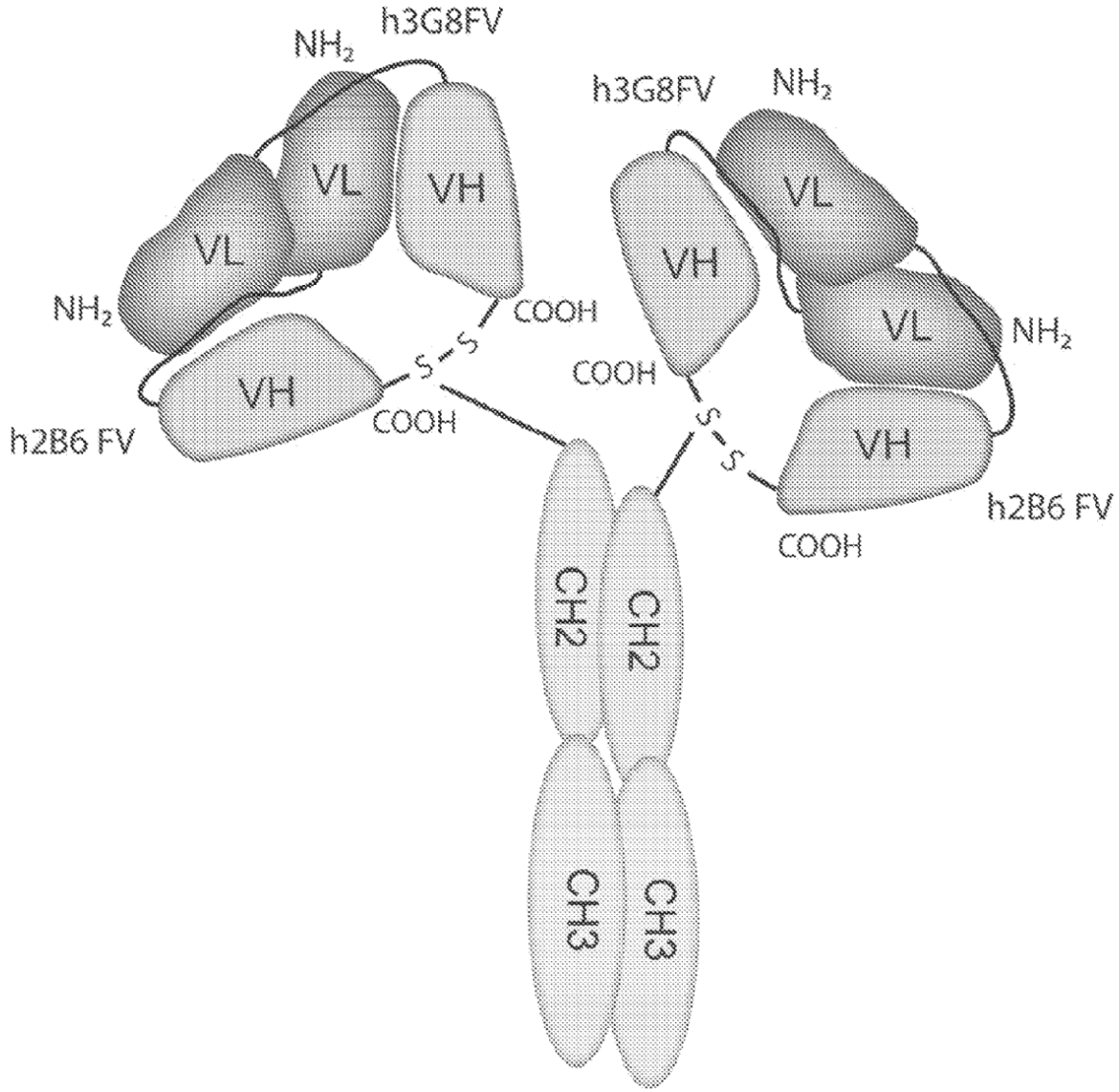

h3G8FV
NH2
VL
VH
VL
NH2
COOH
S-S
VH
COOH
h2B6 FV
h3G8FV
NH2
VL
VH
VL
NH2
COOH
S-S
VH
h2B6 FV
COOH
CH2
CH2
CH3
CH3

FIG. 13

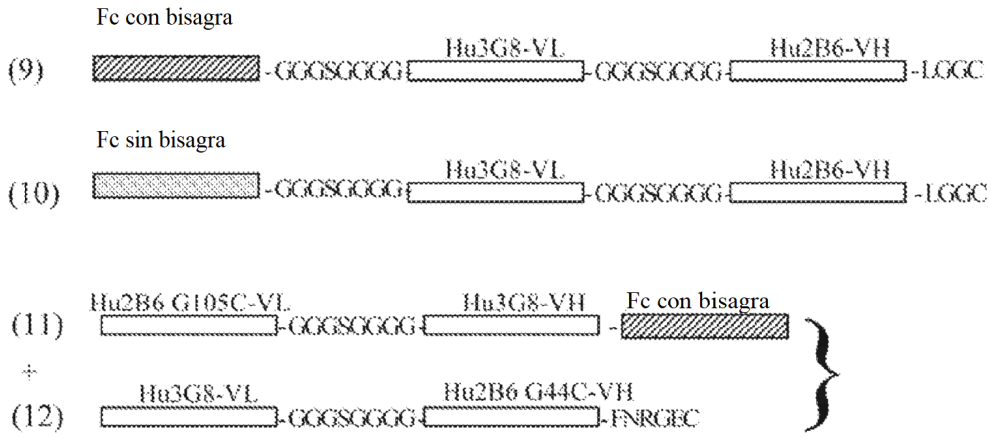

Fc con bisagra
(9)
-GGGSGGGG
Hu3G8-VL
-GGGSGGGG
Hu2B6-VH
-LGGC
Fc sin bisagra
(10)
-GGGSGGGG
Hu3G8-VL
-GGGSGGGG
Hu2B6-VH
-LGGC
Hu2B6 G105C-VL
(11)
-GGGSGGGG
Hu3G8-VH
-
Fc con bisagra
+
Hu3G8-VL
(12)
-GGGSGGGG
Hu2B6 G44C-VH
-FNRGEC

FIG. 14

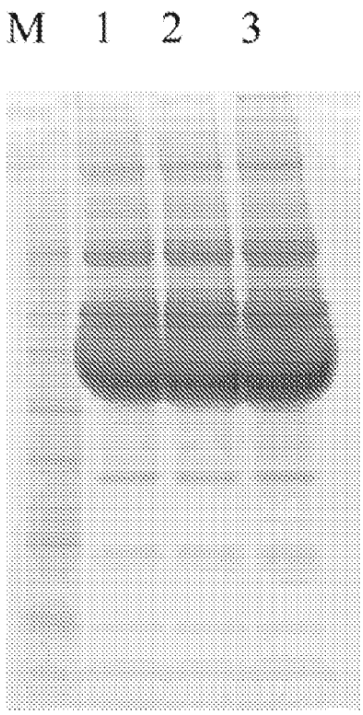


FIG. 15A

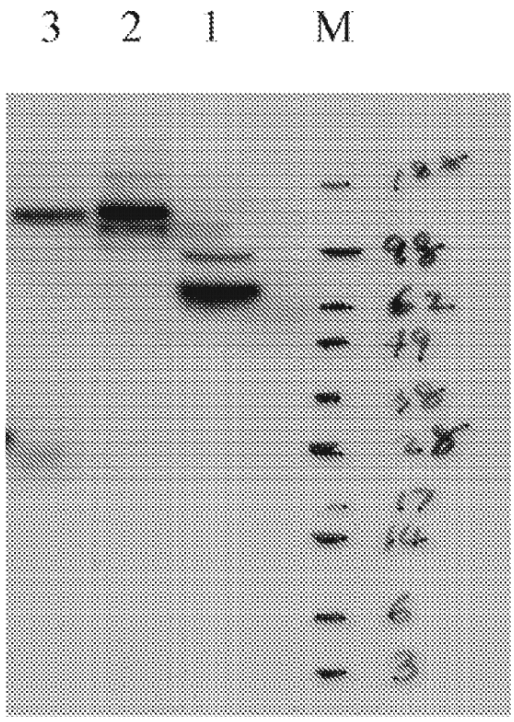


FIG. 15B

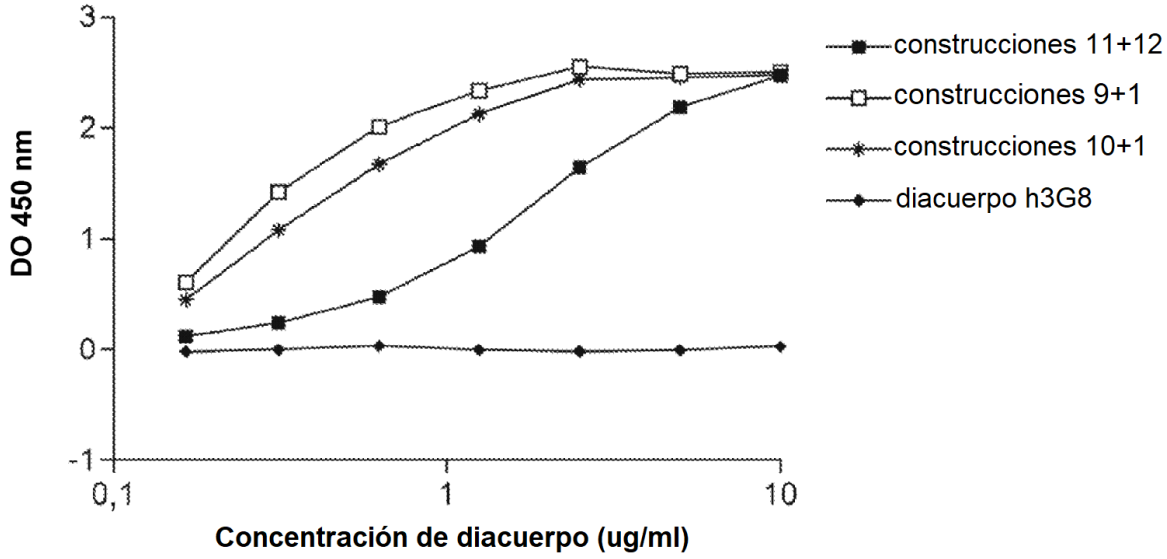

DO 450 nm
3
2
1
0
-1
0,1
1
10
Concentración de diacuerpo (ug/ml)
construcciones 11+12
construcciones 9+1
construcciones 10+1
diacuerpo h3G8

FIG. 16

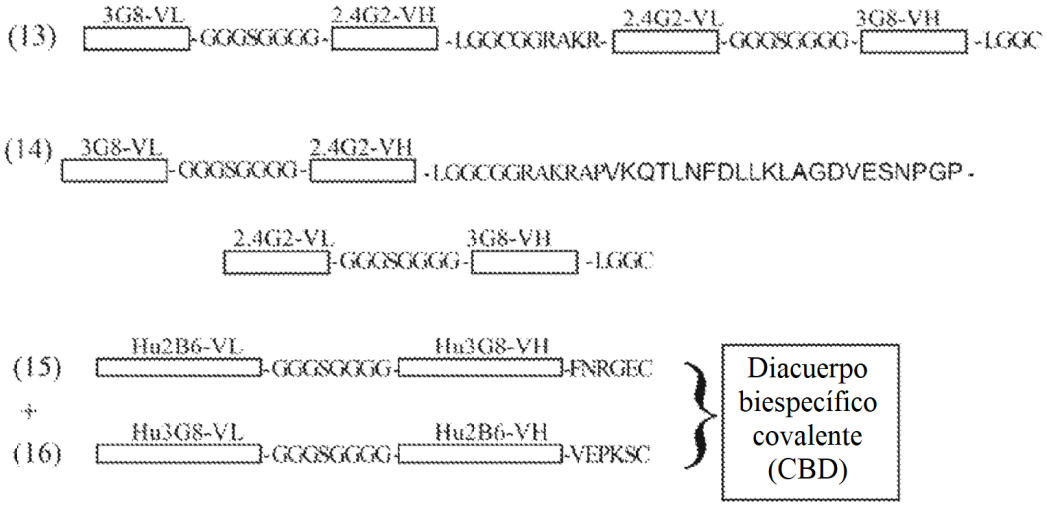

(13) 3G8-VL -GGGSGGGG- 2.4G2-VH -LGGCGGRAKR- 2.4G2-VL -GGGSGGGG- 3G8-VH -LGGC
(14) 3G8-VL -GGGSGGGG- 2.4G2-VH -LGGCGGRAKRAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP-
2.4G2-VL -GGGSGGGG- 3G8-VH -LGGC
(15) Hu2B6-VL -GGGSGGGG- Hu3G8-VH -FNRGEC
+
(16) Hu3G8-VL -GGGSGGGG- Hu2B6-VH -VEPKSC
Diacuerpo biespecífico covalente (CBD)

FIG. 17

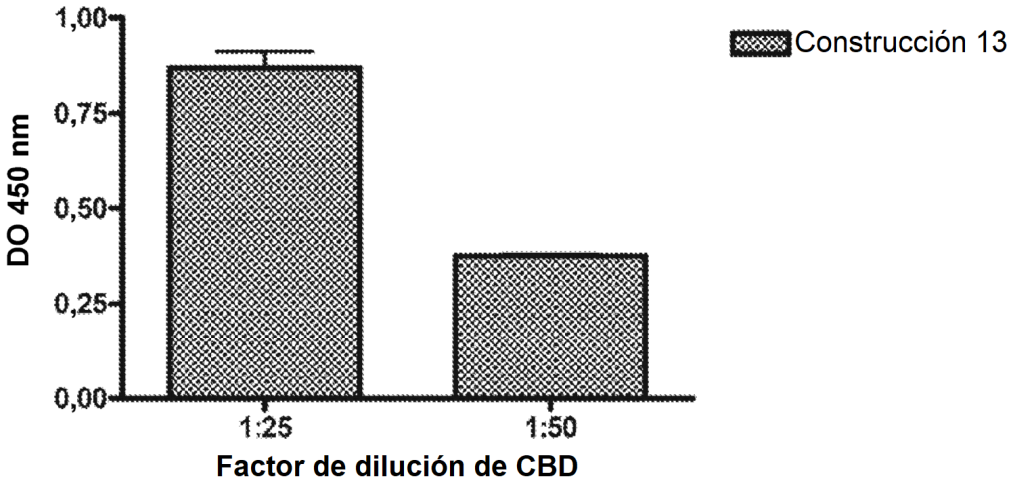

1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
DO 450 nm
1:25
1:50
Factor de dilución de CBD
Construcción 13

FIG. 18

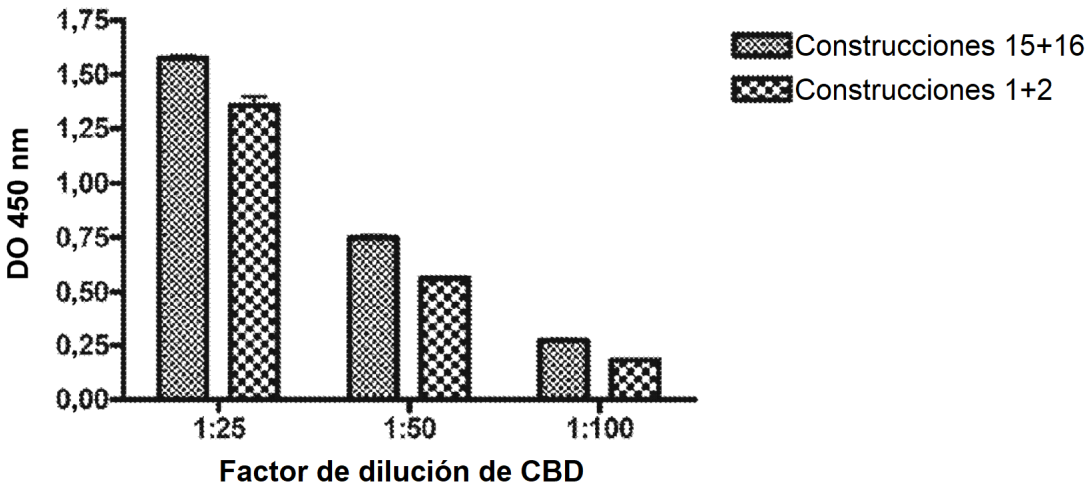
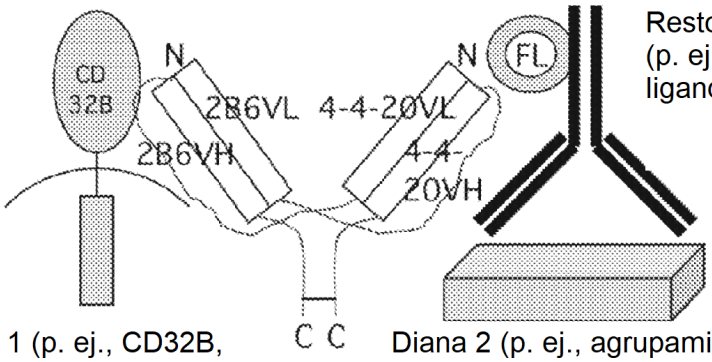

1,75
1,50
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
DO 450 nm
1:25
1:50
1:100
Factor de dilución de CBD
Construcciones 15+16
Construcciones 1+2

FIG. 19



Resto de unión conjugado a Fl (p. ej., MAb, Fab, scFv, DART, ligando, molécula pequeña)

Diana 1 (p. ej., CD32B, otro efector inmunitario, receptor o diana sin células)

Diana 2 (p. ej., agrupamiento intracelular, reclutamiento intercelular, reclutamiento sin células o múltiples dianas)

FIG. 20

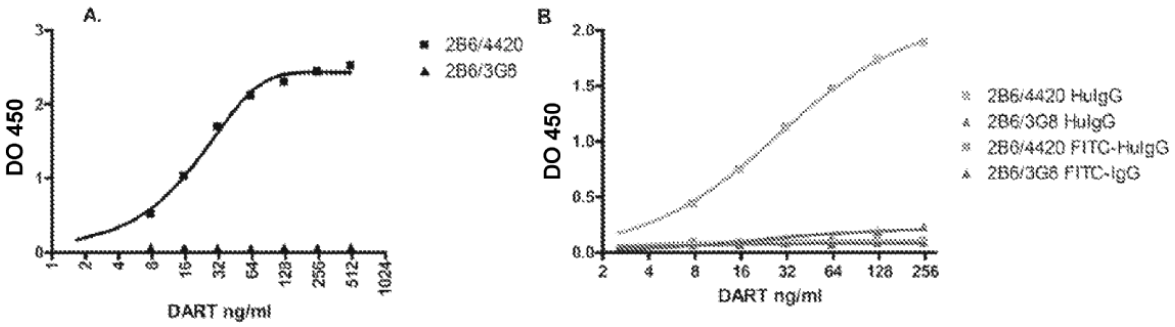


FIG. 21

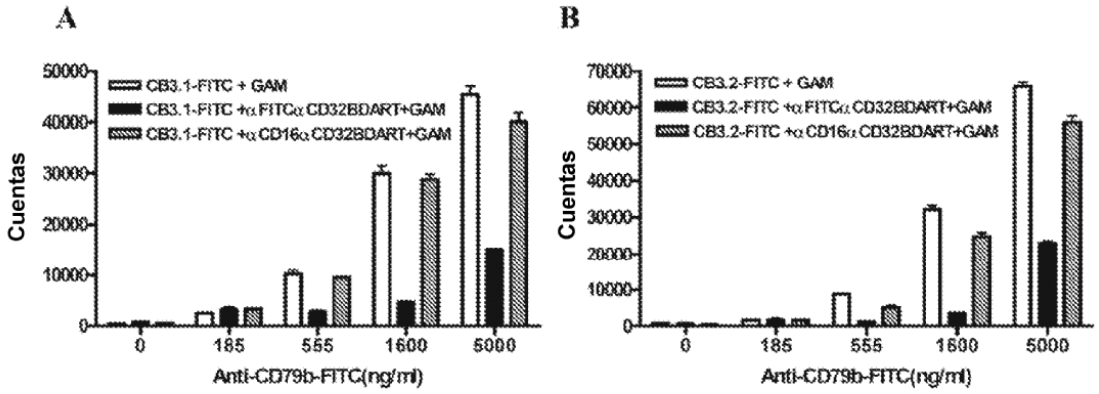


FIG. 22

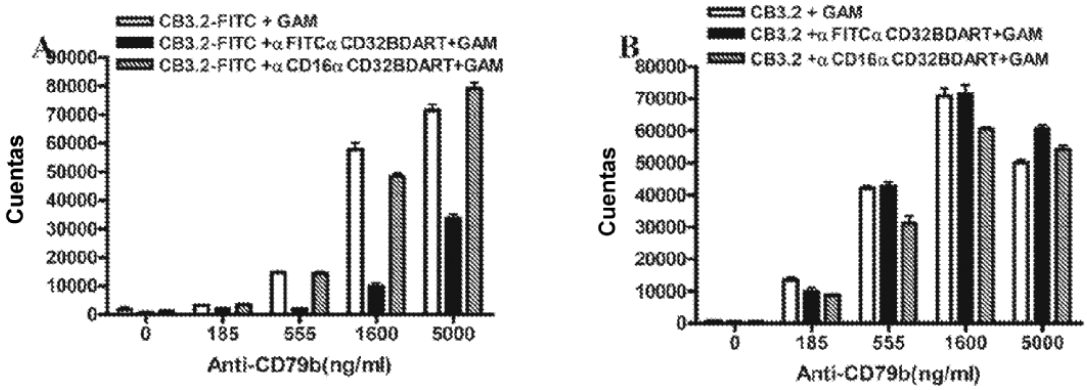


FIG. 23

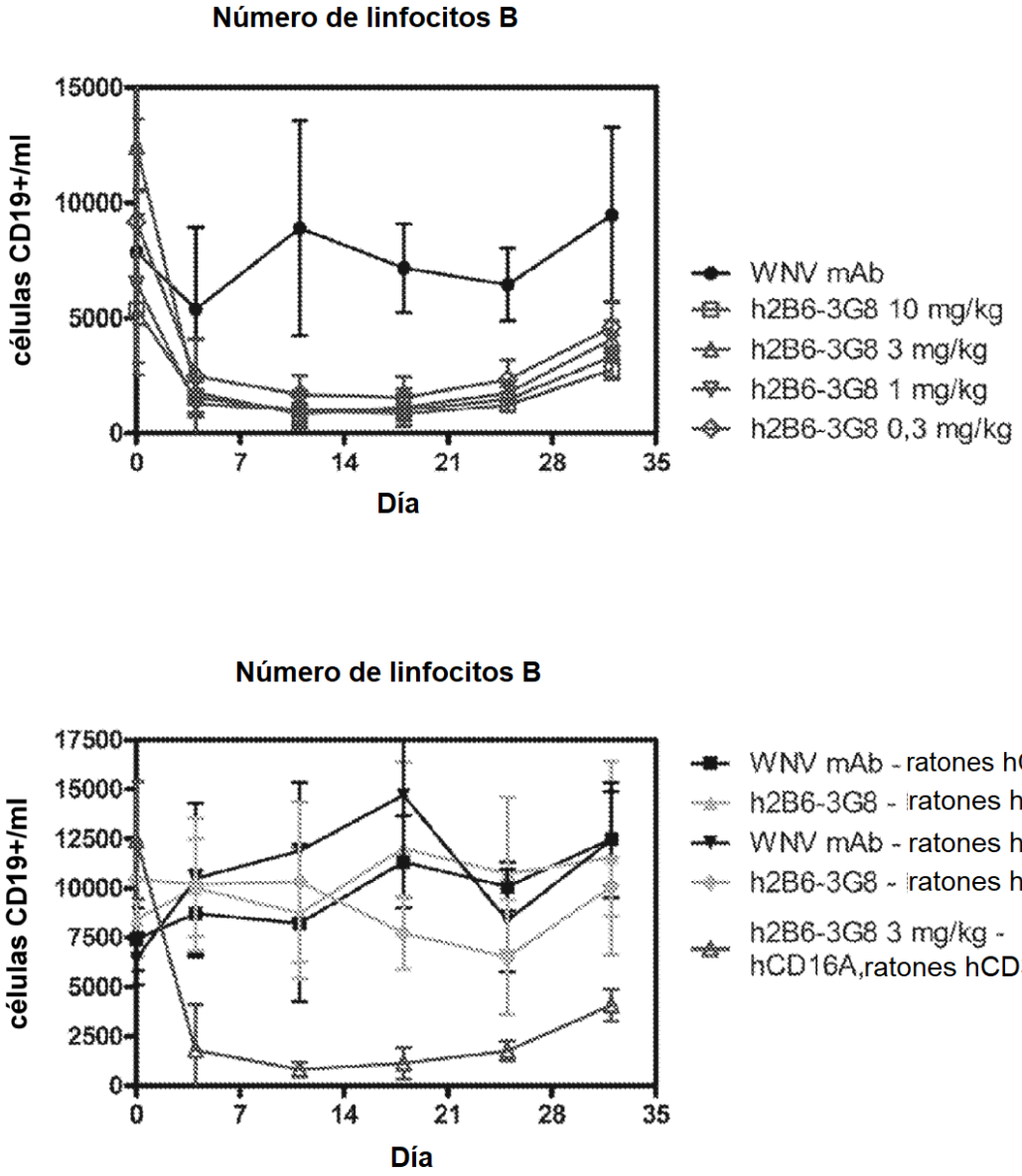

Número de linfocitos B
células CD19+/ml
15000
10000
5000
0
0
7
14
21
28
35
Día
WNV mAb
h2B6-3G8 10 mg/kg
h2B6-3G8 3 mg/kg
h2B6-3G8 1 mg/kg
h2B6-3G8 0,3 mg/kg
Número de linfocitos B
células CD19+/ml
17500
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
0
7
14
21
28
35
Día
WNV mAb - ratones hCD16A
h2B6-3G8 - ratones hCD16A
WNV mAb - ratones hCD32B
h2B6-3G8 - ratones hCD32B
h2B6-3G8 3 mg/kg - hCD16A,ratones hCD32B

FIG. 24

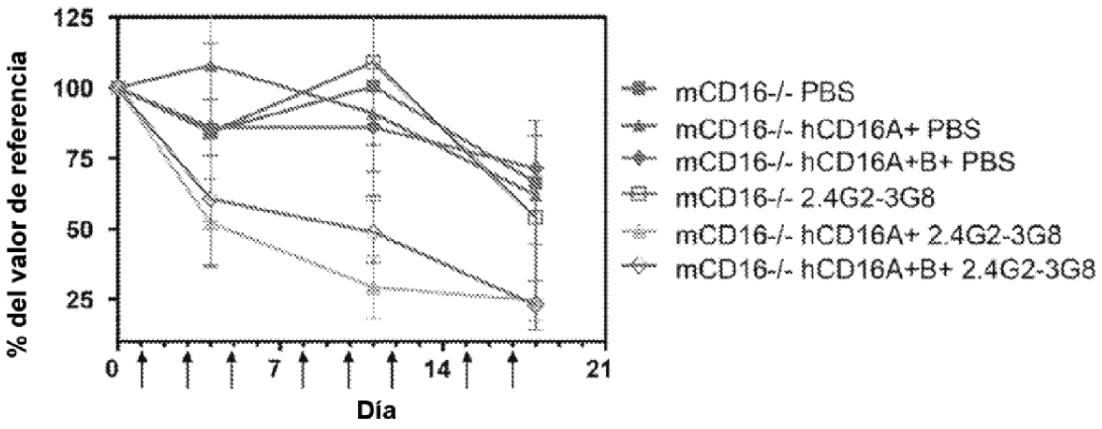

% del valor de referencia
125
100
75
50
25
0
7
14
21
Día
mCD16-/- PBS
mCD16-/- hCD16A+ PBS
mCD16-/- hCD16A+B+ PBS
mCD16-/- 2.4G2-3G8
mCD16-/- hCD16A+ 2.4G2-3G8
mCD16-/- hCD16A+B+ 2.4G2-3G8

FIG. 25

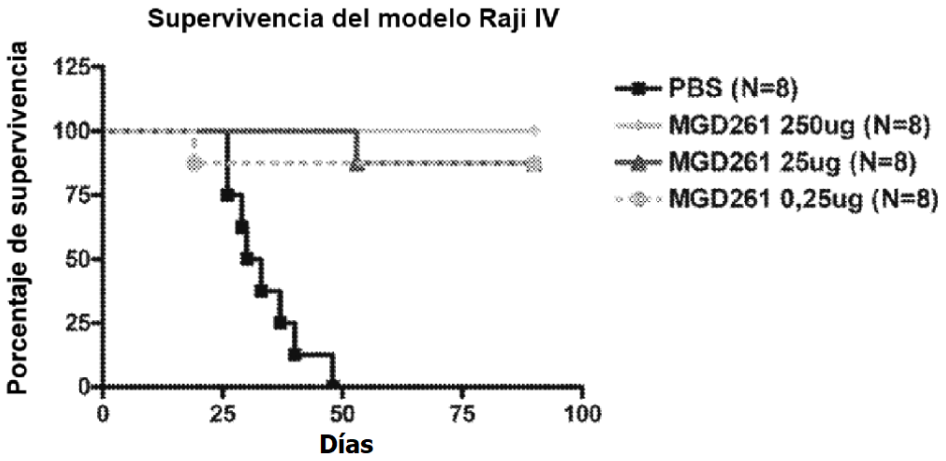

Supervivencia del modelo Raji IV
Porcentaje de supervivencia
125
100
75
50
25
0
0
25
50
75
100
Días
PBS (N=8)
MGD261 250ug (N=8)
MGD261 25ug (N=8)
MGD261 0,25ug (N=8)

FIG. 26

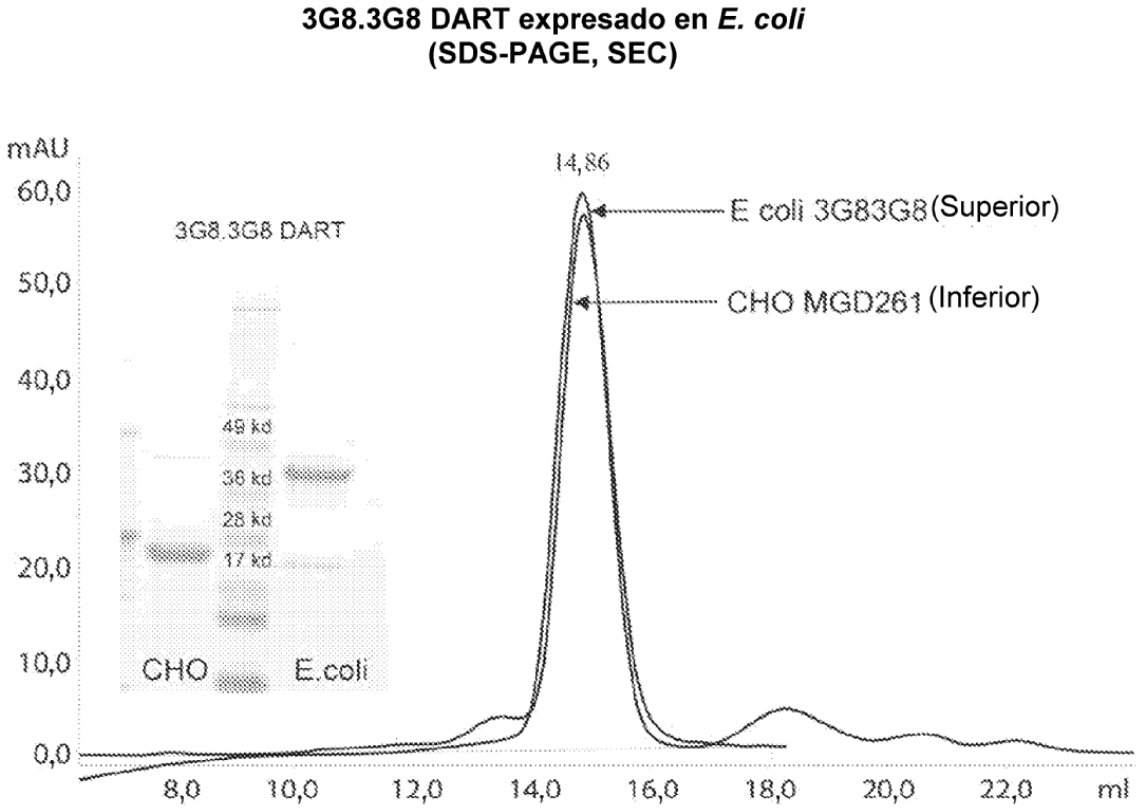

3G8.3G8 DART expresado en E. coli
(SDS-PAGE, SEC)
mAU
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
14,86
E coli 3G83G8 (Superior)
CHO MGD261 (Inferior)
3G8.3G8 DART
49 kd
38 kd
28 kd
17 kd
CHO
E.coli
8,0
10,0
12,0
14,0
16,0
18,0
20,0
22,0
ml

FIG. 27

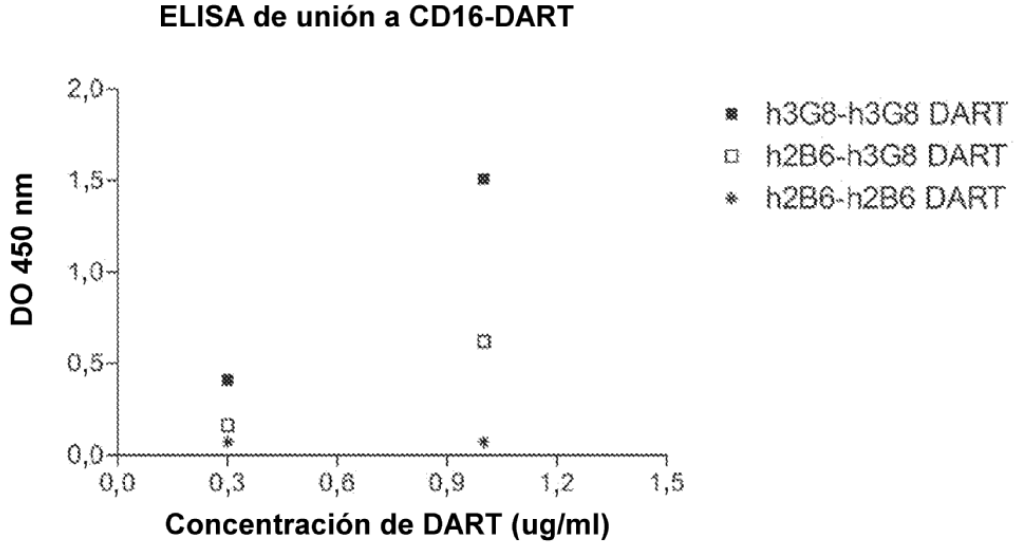

ELISA de unión a CD16-DART
DO 450 nm
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,0
0,3
0,6
0,9
1,2
1,5
Concentración de DART (ug/ml)
h3G8-h3G8 DART
h2B6-h3G8 DART
h2B6-h2B6 DART

FIG. 28

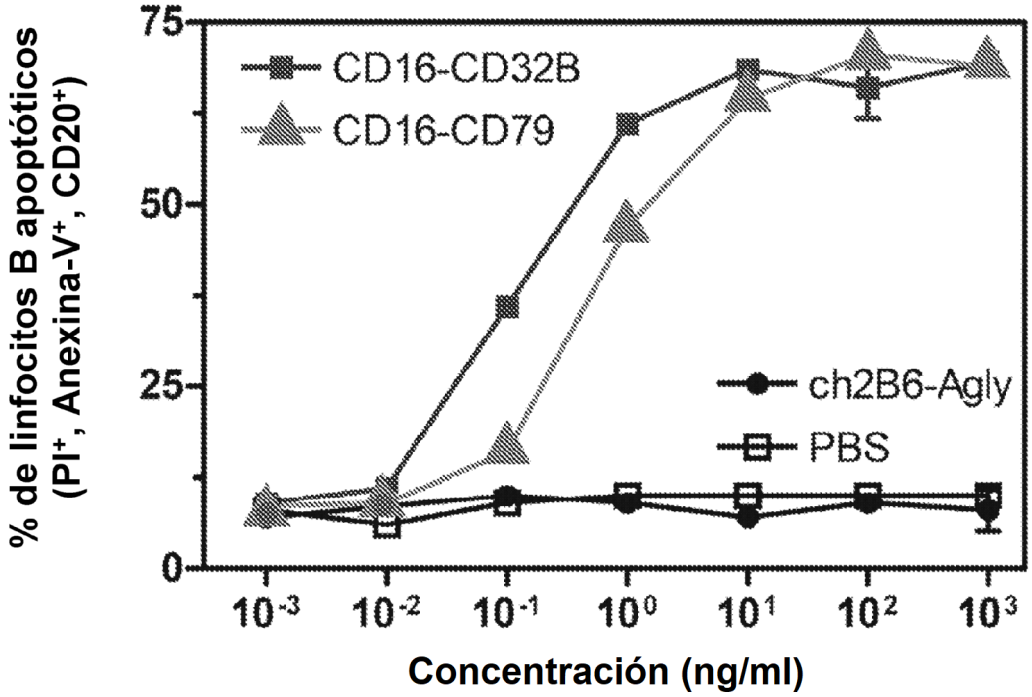

% de linfocitos B apoptóticos
(PI+, Anexina-V+, CD20+)
75
50
25
0
CD16-CD32B
CD16-CD79
ch2B6-Agly
PBS
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
Concentración (ng/ml)

FIG. 29

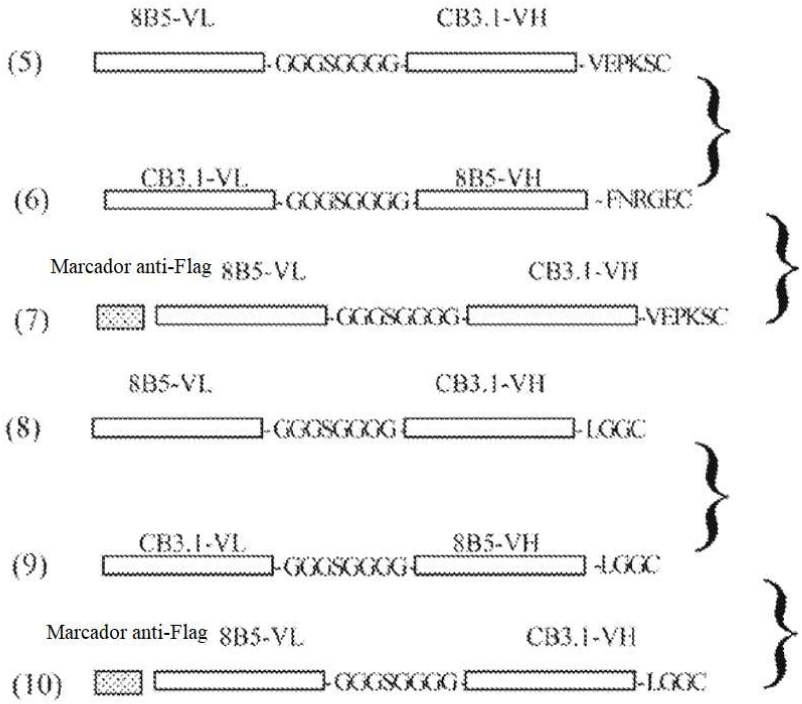

8B5-VL
CB3.1-VH
(5)
-GGGSGGGG-
-VEPKSC
CB3.1-VL
8B5-VH
(6)
-GGGSGGGG-
-FNRGEC
Marcador anti-Flag
8B5-VL
CB3.1-VH
(7)
-GGGSGGGG-
-VEPKSC
8B5-VL
CB3.1-VH
(8)
-GGGSGGGG-
-LGGC
CB3.1-VL
8B5-VH
(9)
-GGGSGGGG-
-LGGC
Marcador anti-Flag
8B5-VL
CB3.1-VH
(10)
-GGGSGGGG-
-LGGC

FIG. 30

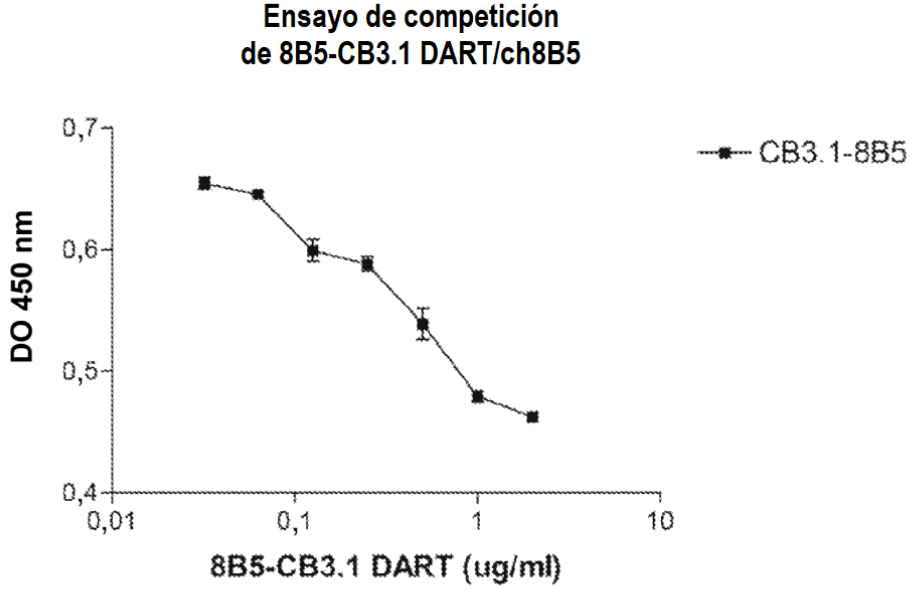

Ensayo de competición
de 8B5-CB3.1 DART/ch8B5
CB3.1-8B5
DO 450 nm
0,7
0,6
0,5
0,4
0,01
0,1
1
10
8B5-CB3.1 DART (ug/ml)

FIG. 31

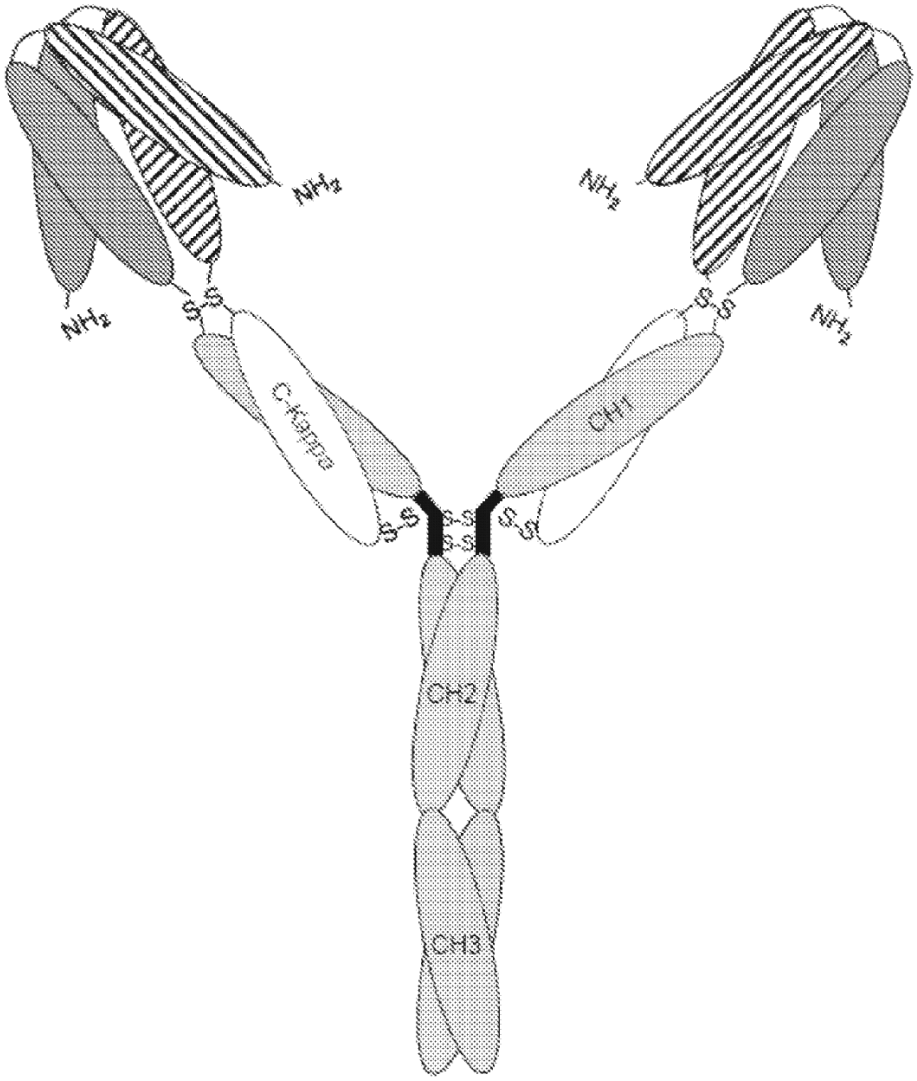
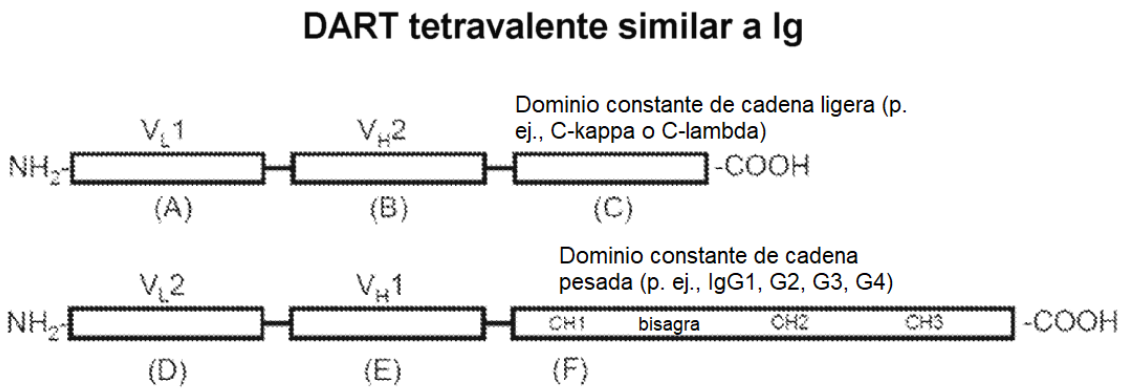


FIG. 32



(A) + (E) = sitio de unión a epítopo 1
(D) + (B) = sitio de unión a epítopo 2
(C) + (F) = C-kappa/lambda + CH_1 (asociación similar a la de una Ig tradicional)
bisagra-CH2-CH3 se asociarán para formar un Fc

FIG. 33

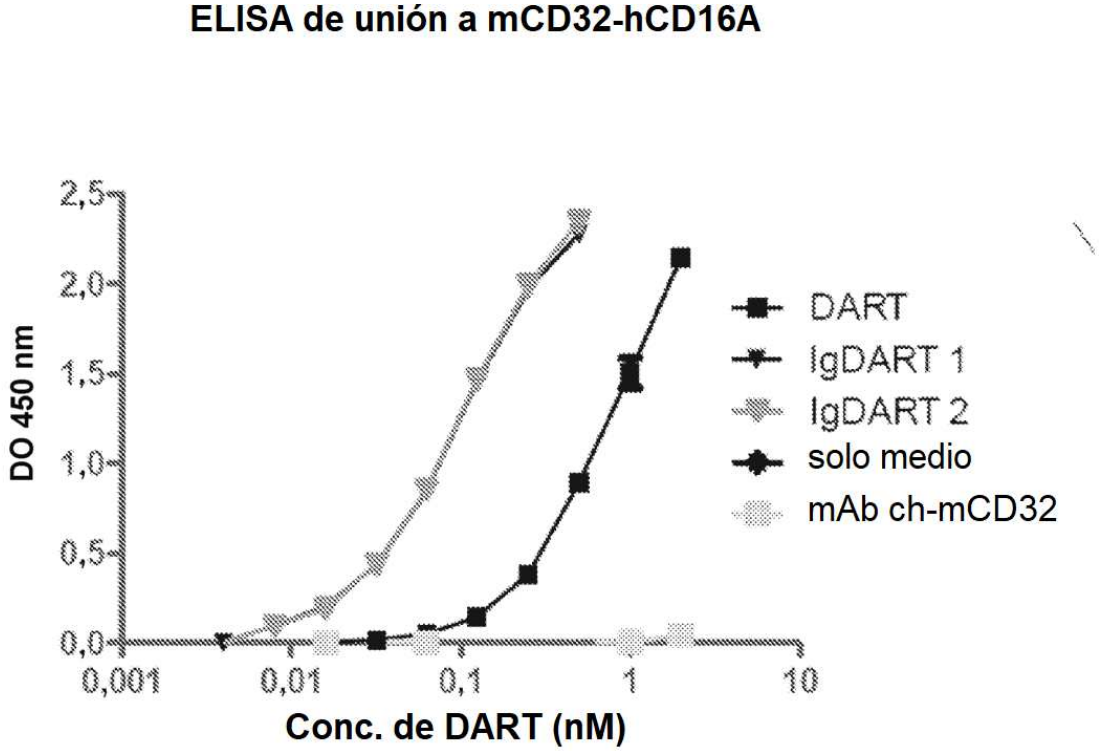


FIG. 34

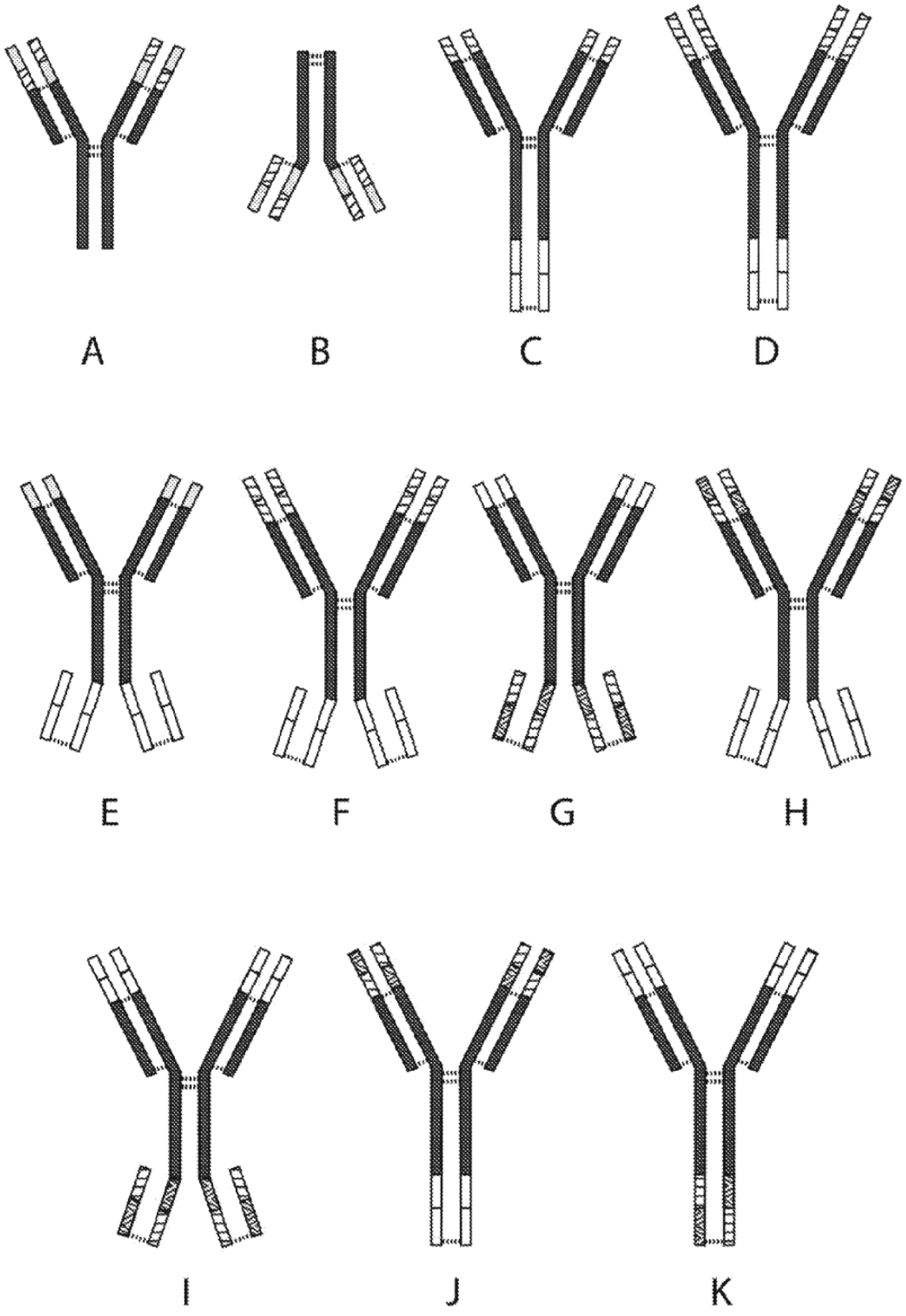


FIG. 35

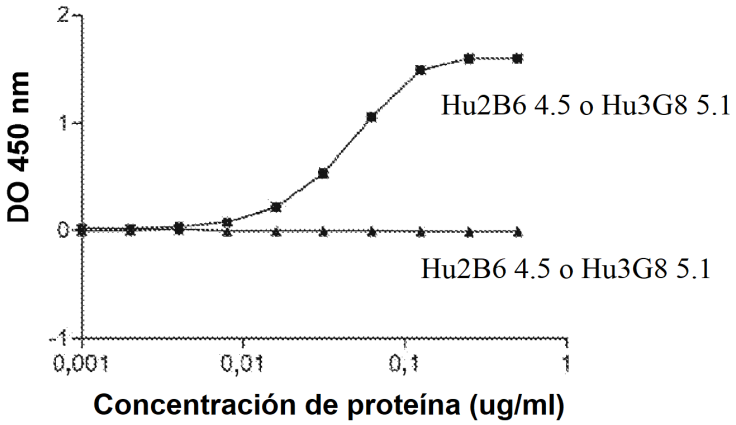

DO 450 nm
2
1
0
-1
0,001
0,01
0,1
1
Concentración de proteína (ug/ml)
Hu2B6 4.5 o Hu3G8 5.1
Hu2B6 4.5 o Hu3G8 5.1

FIG. 36

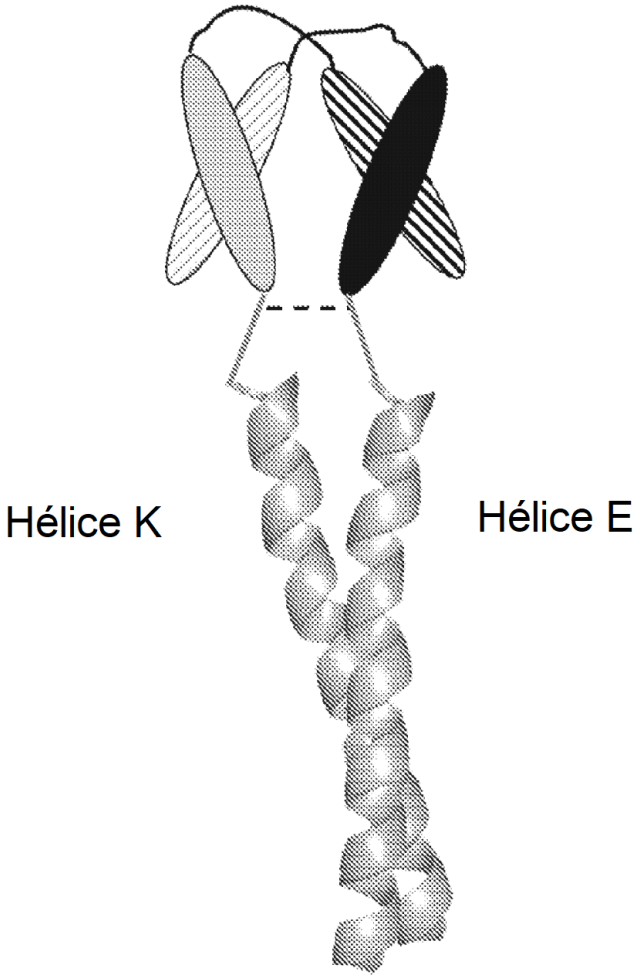


FIG. 37

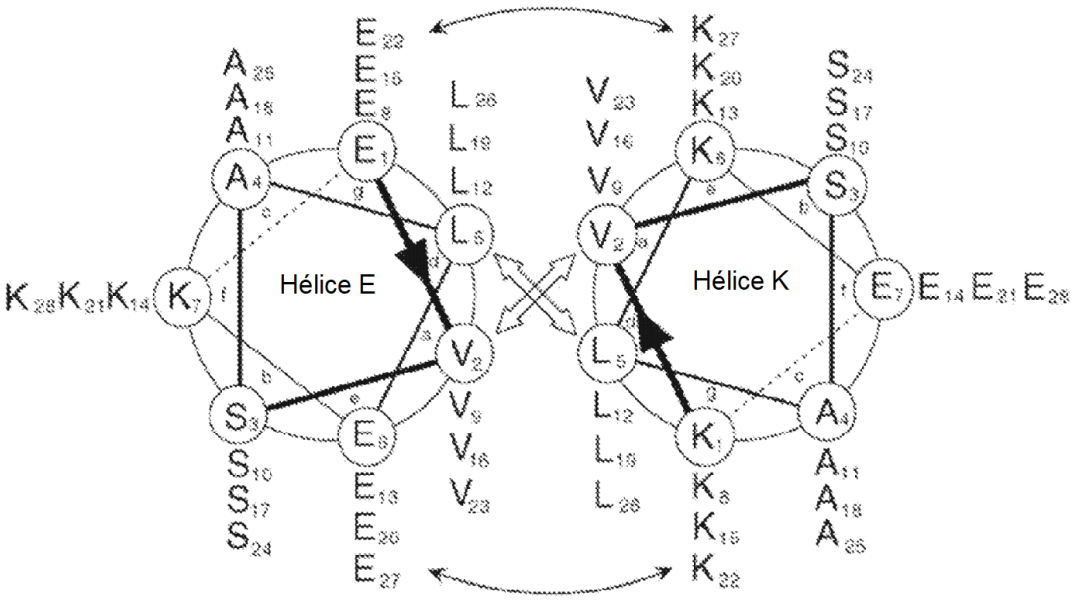


FIG. 38

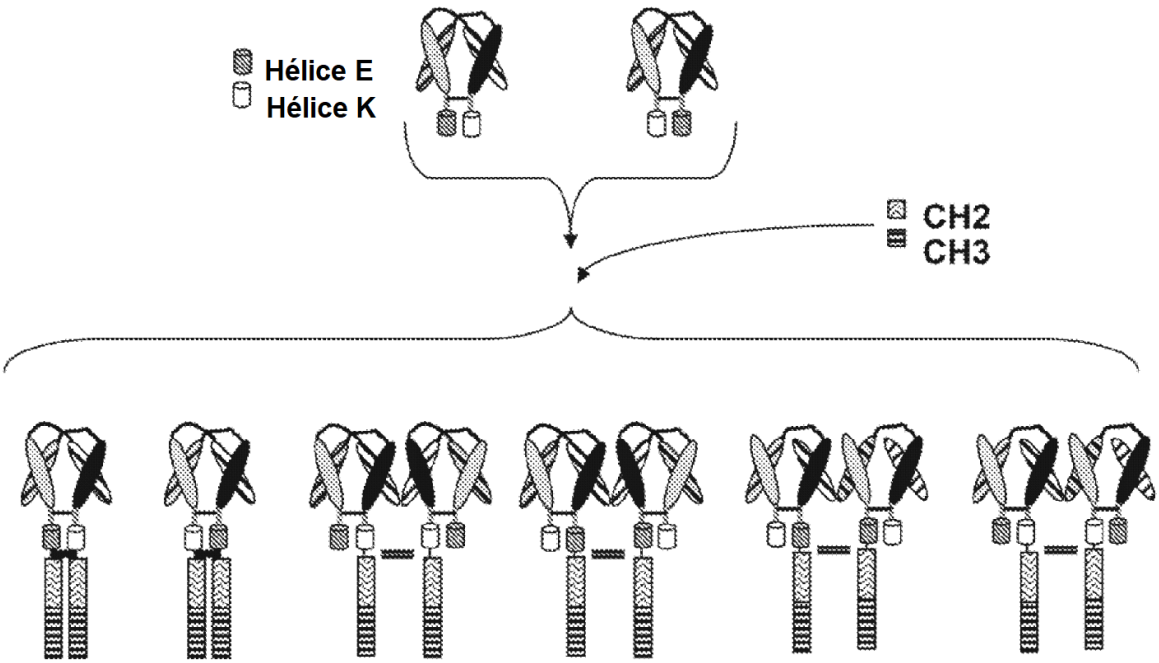


Figura 39

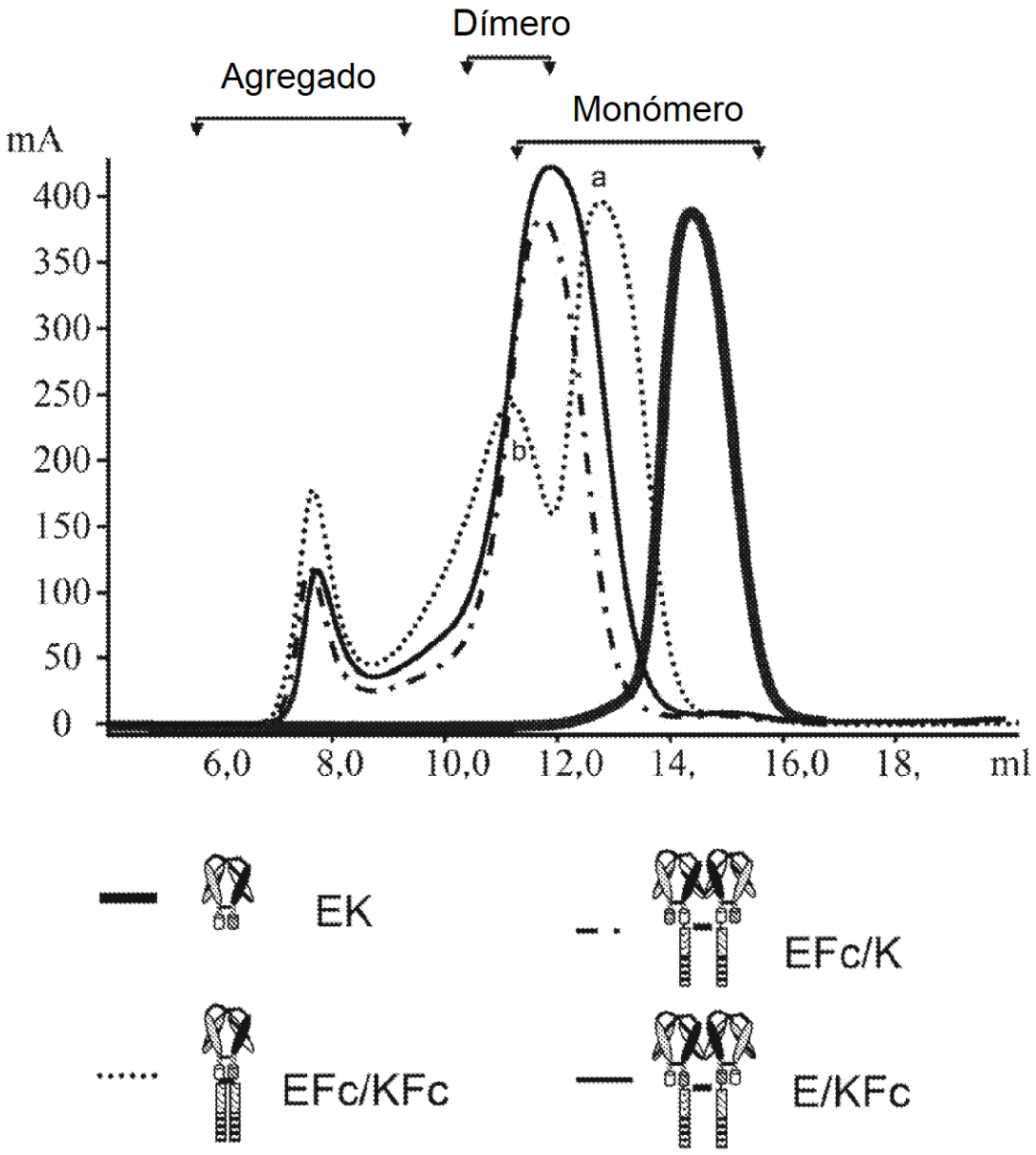

Dímero
Agregado
Monómero
mA
400
350
300
250
200
150
100
50
0
a
b
6,0
8,0
10,0
12,0
14,
16,0
18,
ml
EK
EFc/K
EFc/KFc
E/KFc

Figura 40

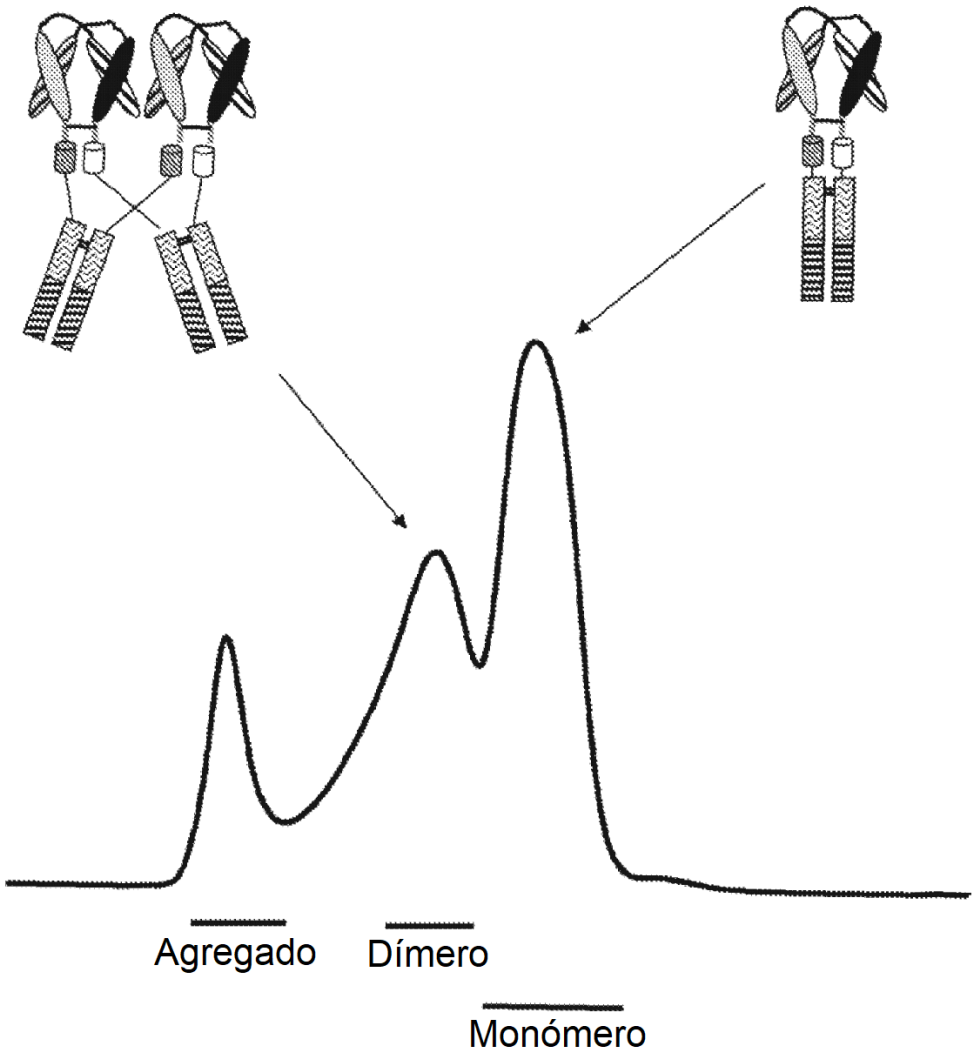


Figura 41

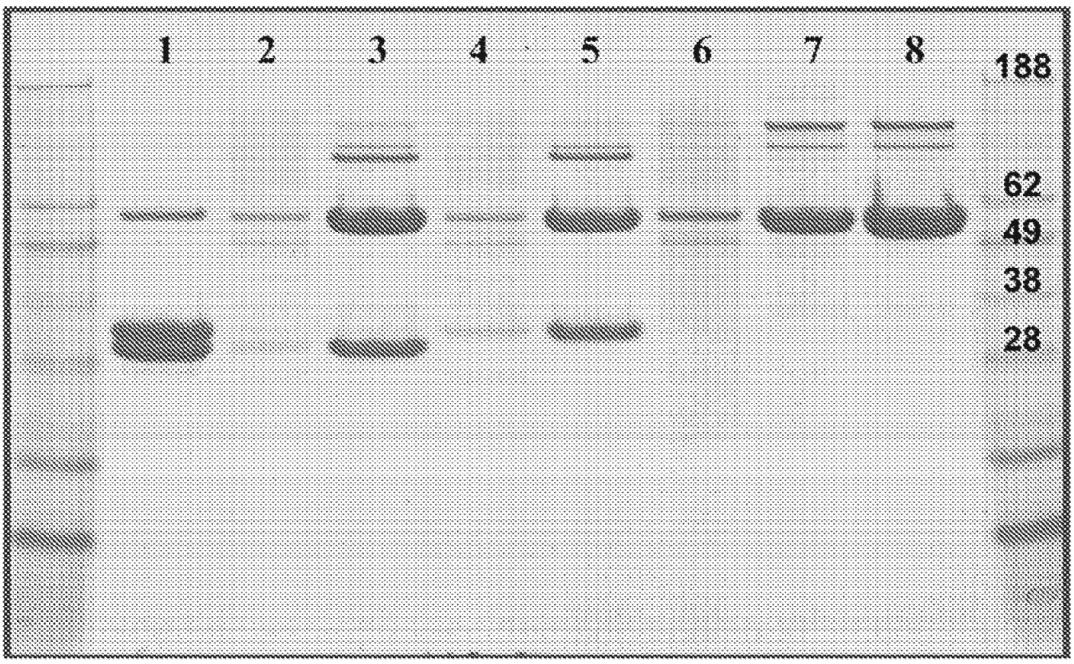


Figura 42

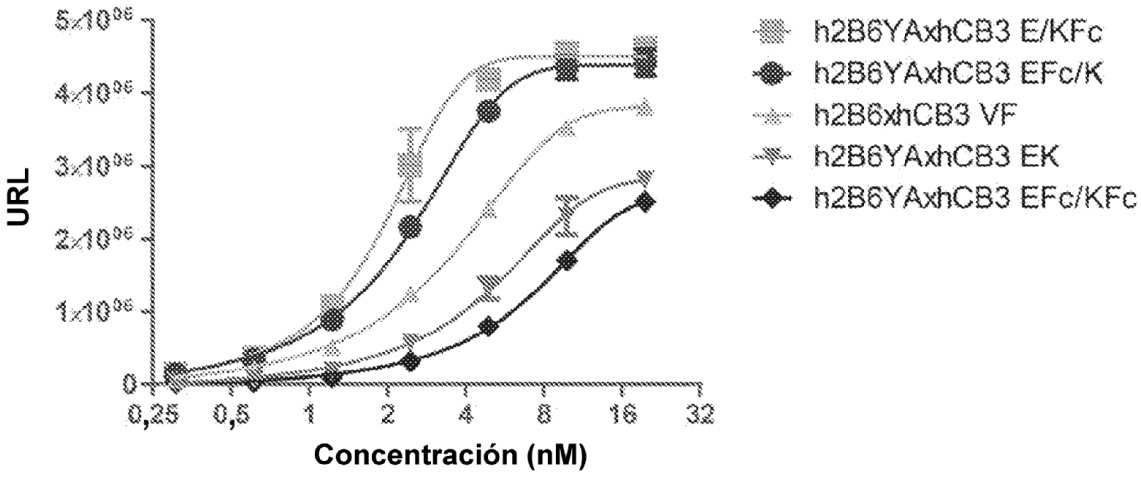

URL
5x10^06
4x10^06
3x10^06
2x10^06
1x10^06
0
0,25
0,5
1
2
4
8
16
32
Concentración (nM)
h2B6YAxhCB3 E/KFc
h2B6YAxhCB3 EFc/K
h2B6xhCB3 VF
h2B6YAxhCB3 EK
h2B6YAxhCB3 EFc/KFc

Figura 43

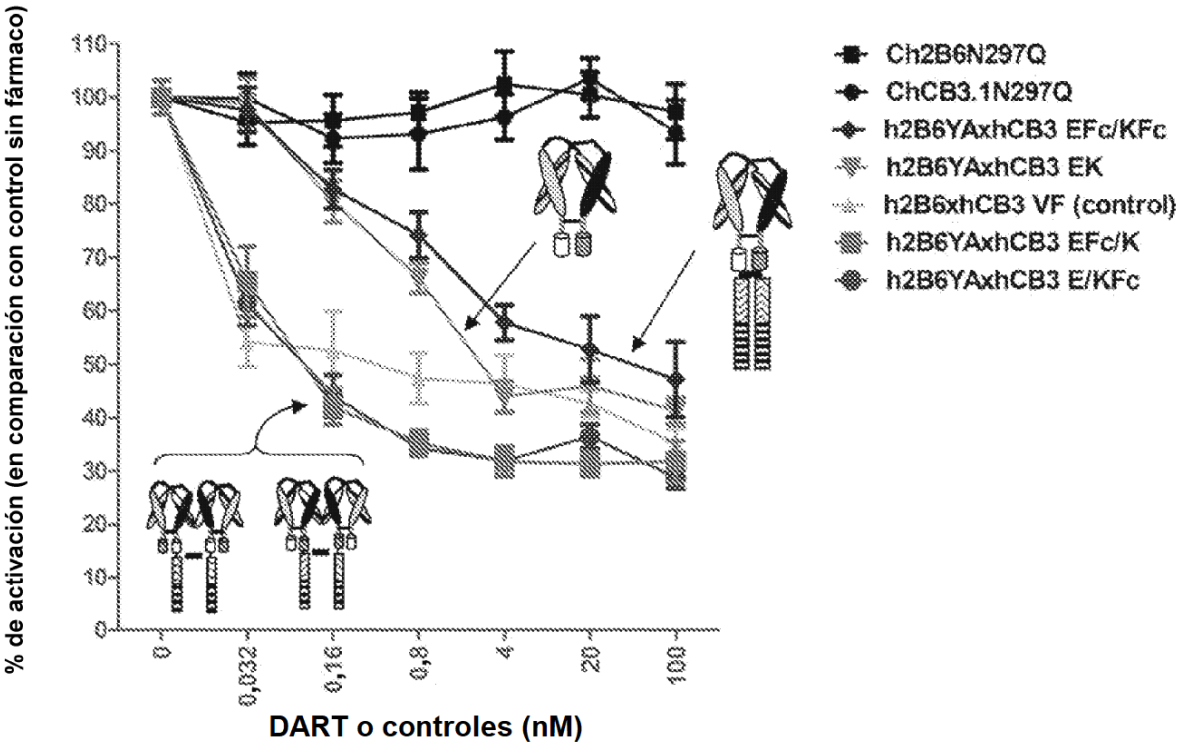

% de activación (en comparación con control sin fármaco)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0,032
0,16
0,8
4
20
100
DART o controles (nM)
Ch2B6N297Q
ChCB3.1N297Q
h2B6YAxhCB3 EFc/KFc
h2B6YAxhCB3 EK
h2B6xhCB3 VF (control)
h2B6YAxhCB3 EFc/K
h2B6YAxhCB3 E/KFc

Figura 44

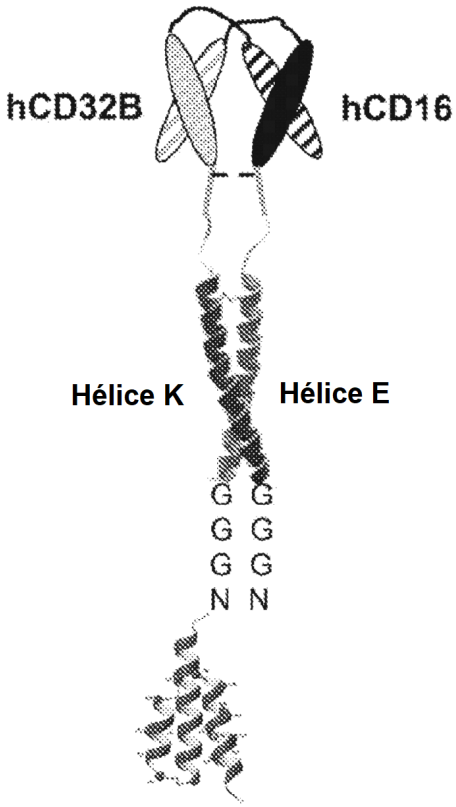


FIG. 45

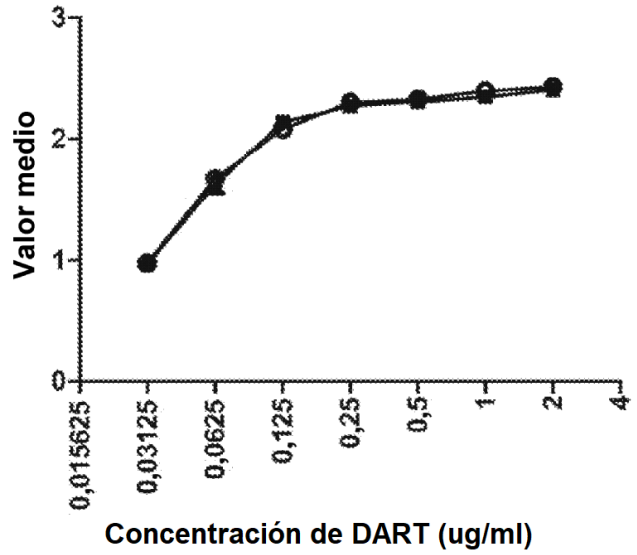


FIG. 46A

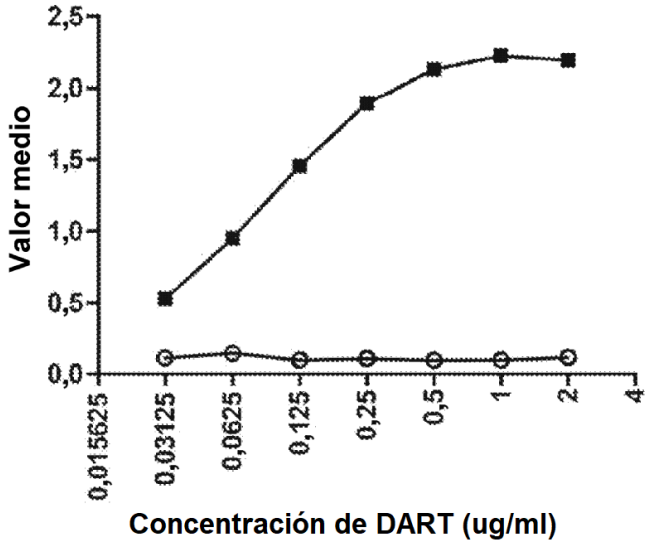


FIG. 46B

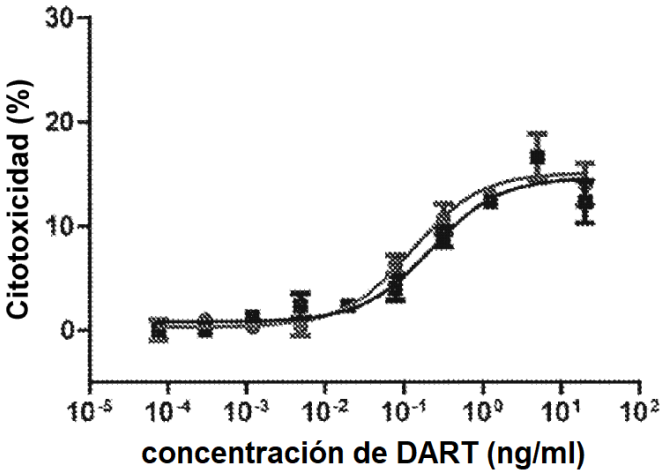

30
20
10
0
Citotoxicidad (%)
10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100 101 102
concentración de DART (ng/ml)

FIG. 47

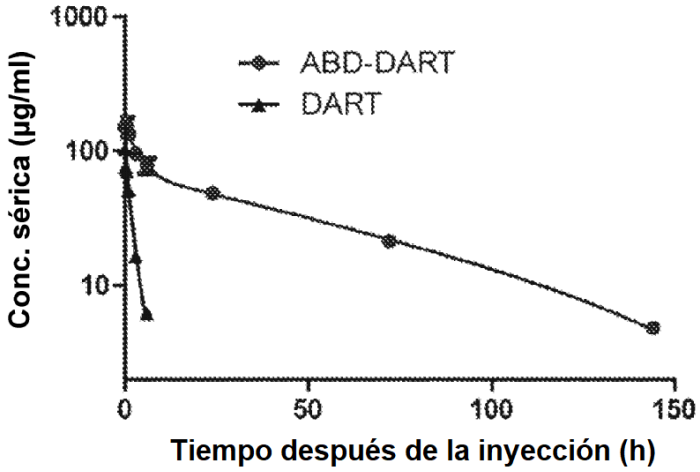

1000
100
10
Conc. sérica (µg/ml)
ABD-DART
DART
0
50
100
150
Tiempo después de la inyección (h)

FIG. 48

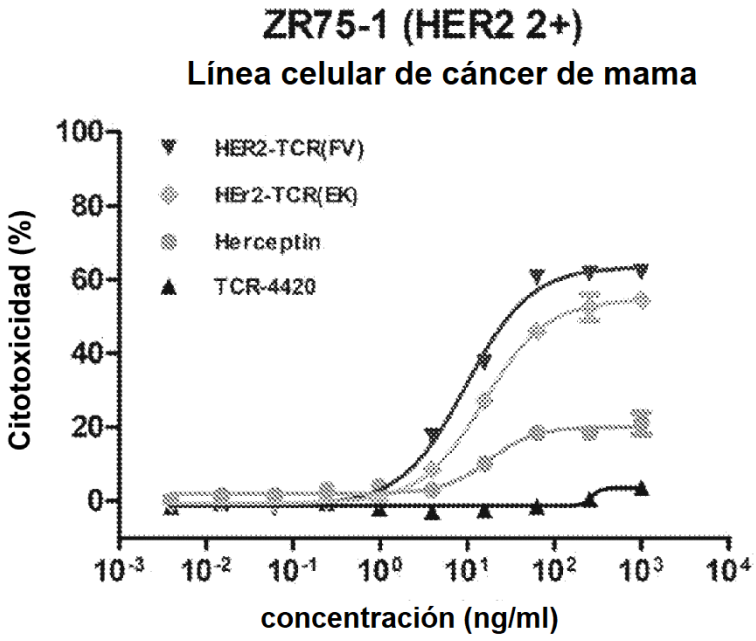


FIG. 49A

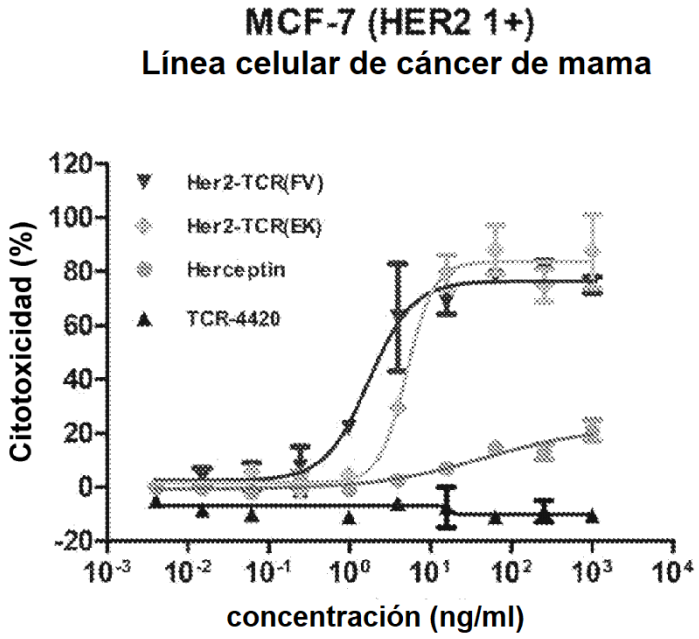


FIG. 49B

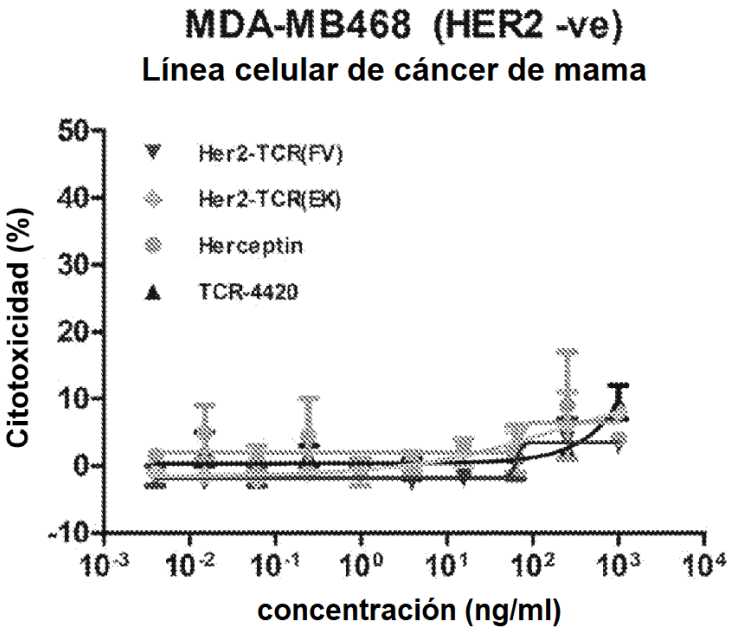


FIG. 49C

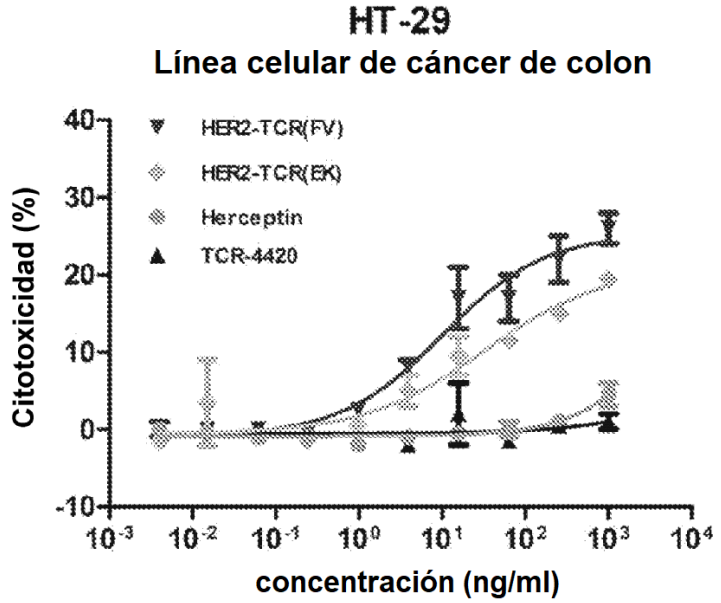


FIG. 49D

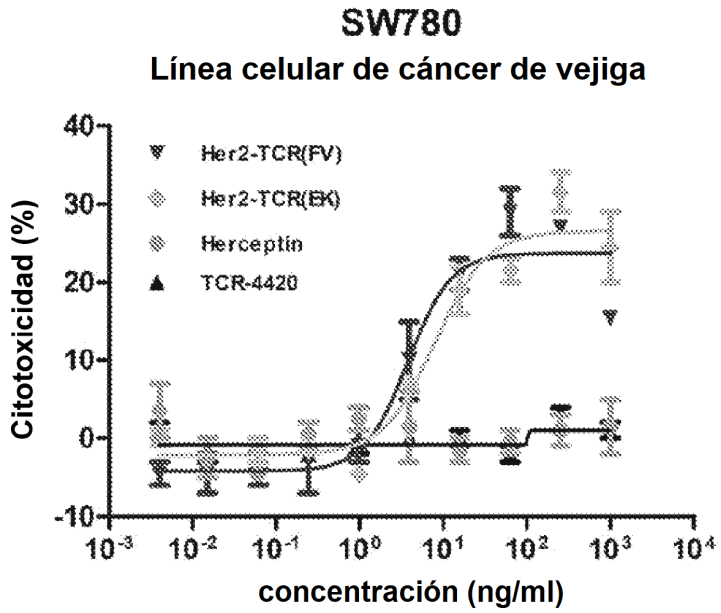

SW780
Línea celular de cáncer de vejiga
Citotoxicidad (%)
40
30
20
10
0
-10
Her2-TCR(FV)
Her2-TCR(BK)
Herceptin
TCR-4420
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
104
concentración (ng/ml)

FIG. 49E