

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 847 973**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2017 PCT/EP2017/083222**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2018 WO18114748**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2017 E 17829176 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020 EP 3559034**

(54) Título: **Politerapia de anticuerpos biespecíficos anti-CD20/anti-CD3 y agonistas de 4-1BB (CD137)**

(30) Prioridad:

20.12.2016 EP 16205493

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

04.08.2021

(73) Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

(72) Inventor/es:

**BACAC, MARINA;
FERRARA KOLLER, CLAUDIA;
KLEIN, CHRISTIAN;
PERRO, MARIO;
SAM, JOHANNES;
UMANA, PABLO y
XU, WEI**

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 847 973 T3

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

DESCRIPCIÓN

Politerapia de anticuerpos biespecíficos anti-CD20/anti-CD3 y agonistas de 4-1BB (CD137)

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a politerapias que emplean anticuerpos biespecíficos anti-CD20/anti-CD3 y agonistas de 4-1BB (CD137), en particular trímeros de 4-1BBL que contienen moléculas de unión a antígeno, el uso de estas politerapias para el tratamiento del cáncer y procedimientos para el uso de los politerapias.

10 ANTECEDENTES

Los trastornos proliferativos de linfocitos B describen un grupo heterogéneo de neoplasias malignas que incluye tanto leucemias como linfomas. Los linfomas se desarrollan a partir de células linfáticas e incluyen dos categorías principales: linfomas de Hodgkin (LH) y linfomas no Hodgkin (LNH). En los Estados Unidos, los linfomas con origen en los linfocitos B constituyen aproximadamente el 80-85 % de todos los casos de linfoma no Hodgkin, y existe una heterogeneidad considerable dentro del subconjunto de linfocitos B, en base a patrones de expresión genotípica y fenotípica en el linfocito B de origen. Por ejemplo, los subconjuntos de linfomas de linfocitos B incluyen enfermedades poco activas e incurables de crecimiento lento, tales como el linfoma folicular (LF) o la leucemia linfocítica crónica (LLC), así como los subtipos más agresivos, el linfoma de células del manto (LCM) y el linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG). A pesar de la disponibilidad de diversos agentes para el tratamiento de los trastornos proliferativos de linfocitos B, existe una necesidad continua de desarrollo de tratamientos seguros y eficaces para prolongar la remisión y mejorar las tasas de curación en los pacientes.

25 Un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 es una molécula que se dirige al CD20 expresado en los linfocitos B y a la cadena épsilon de CD3 (CD3 ϵ) presente en los linfocitos T. La unión simultánea da lugar a la activación de los linfocitos T y a la muerte de los linfocitos B mediada por los linfocitos T. En presencia de linfocitos B CD20 $^{+}$, ya sean circulantes o residentes en tejidos, las dosis farmacológicamente activas de anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 desencadenarán la activación de linfocitos T y la liberación de citocina asociada. Paralelamente a 30 la disminución de los linfocitos B en la sangre periférica, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 da lugar a una disminución transitoria de los linfocitos T en la sangre periférica dentro de las 24 horas posteriores a la primera administración, y a un pico en la liberación de citocinas, seguido de una rápida recuperación de los linfocitos T y del retorno en 72 horas de los niveles de citocinas a los valores iniciales. Por tanto, para lograr la eliminación completa de las células tumorales, existe la necesidad de un agente adicional que conserve la activación de los linfocitos T y proporcione una respuesta inmunitaria duradera a las células cancerosas.

35 El 4-1BB (CD137), un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (FNT), se identificó por primera vez como una molécula inducible expresada por linfocitos T activos (Kwon y Weissman, 1989). Estudios posteriores demostraron que muchas otras células inmunitarias también expresan 4-1BB, incluyendo 40 linfocitos NK, linfocitos B, linfocitos NKT, monocitos, neutrófilos, mastocitos, células dendríticas (CD) y células de origen no hematopoyético, tales como las células endoteliales y de músculo liso (Vinay y Kwon, 2011). La expresión de 4-1BB en diferentes tipos de células es casi siempre inducible e impulsada por diversas señales estimuladoras, tales como la activación del receptor de linfocitos T (RLT) o del receptor de linfocitos B, así como la señalización 45 que induce moléculas coestimuladoras o receptores de citocinas proinflamatorias (Diehl *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2010).

50 El ligando de 4-1BB (4-1BBL o CD137L) se identificó en 1993 (Goodwin *et al.*, 1993). Se ha demostrado que la expresión de 4-1BBL estaba restringida en células presentadoras de antígeno profesionales (CPA) tales como linfocitos B, CD y macrófagos. La expresión inducible de 4-1BBL es característica de los linfocitos T, incluyendo tanto subconjuntos de linfocitos T $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$, y células endoteliales (Shao y Schwarz, 2011).

55 La coestimulación a través del receptor 4-1BB (por ejemplo, mediante unión a 4-1BBL) activa múltiples cascadas de señalización dentro del linfocito T (tanto en los subconjuntos CD4 $^{+}$ como en los CD8 $^{+}$), lo que aumenta poderosamente la activación de los linfocitos T (Bartkowiak y Curran, 2015). En combinación con la activación del RLT, los anticuerpos agonistas específicos de 4-1BB potencian la proliferación de linfocitos T, estimulan la secreción de linfocinas y disminuyen la sensibilidad de los linfocitos T a la muerte celular inducida por activación (Snell *et al.*, 2011). Este mecanismo se presentó como la primera prueba de concepto en inmunoterapia contra el cáncer. En un modelo preclínico, la administración de un anticuerpo agonista contra 4-1BB en ratones portadores de tumores dio lugar a un potente efecto antitumoral (Melero *et al.*, 1997). Más tarde, la evidencia acumulada indicó 60 que 4-1BB normalmente presenta su potencia como agente antitumoral solo cuando se administra en combinación con otros compuestos inmunomoduladores, reactivos quimioterápicos, vacunación específica para tumores o radioterapia (Bartkowiak y Curran, 2015). LIU RONG ET AL.: "Efficient inhibition of human B-cell lymphoma in SCID mice by synergistic antitumor effect of human 4-1BB ligand/anti-CD20 fusion proteins and anti-CD3/anti-CD20 diabodies", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, EE. UU., vol. 33, n.º 5, 1 de junio de 2010 (01/06/2010), páginas 500-509, documento XP008178640, ISSN: 1537-4513, DOI: 65 10.1097/CJI.0B013E3181D75C20 divulga la administración dirigida de 4-1BBL al sitio tumoral y la inhibición del

linfoma de linfocitos B humanos en ratones con IDCG cuando se combina con diacuerpos anti-CD3/anti-CD20.

Para la señalización de la superfamilia de RFNT se necesita la reticulación de los ligandos trimerizados para acoplarse con los receptores, al igual que los anticuerpos agonistas de 4-1BB, que requieren una unión a Fc natural (Li y Ravetch, 2011). Sin embargo, la administración sistémica de anticuerpos agonistas específicos de 4-1BB con el dominio Fc funcionalmente activo dio como resultado una afluencia de linfocitos T CD8⁺ asociada con toxicidad hepática (Dubrot *et al.*, 2010) que disminuye o mejora significativamente en ausencia de receptores de Fc funcionales en ratones. En el ámbito clínico, un Ab agonista de 4-1BB competente con Fc (BMS-663513) (NCT00612664) causó una hepatitis de grado 4 que dio lugar a la terminación del ensayo (Simeone y Ascierto, 2012). Por lo tanto, existe la necesidad de agonistas de 4-1BB eficaces y más seguros.

Se han preparado proteínas de fusión compuestas por un dominio extracelular de un ligando de 4-1BB y un fragmento de anticuerpo monocatenario (Hornig *et al.*, 2012; Muller *et al.*, 2008) o un único ligando de 4-1BB fusionado al extremo C de una cadena pesada (Zhang *et al.*, 2007). El documento WO 2010/010051 divulga la generación de proteínas de fusión que consisten en tres ectodomios de ligandos de FNT unidos entre sí y fusionados a una parte del anticuerpo. En la presente invención, las moléculas de unión a antígeno compuestas por un ligando de 4-1BB trimérico y por tanto biológicamente activo, un dominio de unión a antígeno específico para el antígeno tumoral CD19 y un dominio Fc inactivo se muestran en particular estables y robustas (en el presente documento se denominan CD19-4-1BBL). Estas construcciones se divultan en el documento WO 2016/075278 y reemplazan la reticulación inespecífica mediada por FcγR responsable de la toxicidad mediada por Fc por la reticulación específica de linfocitos B dirigida a CD19.

CD19 constituye una diana ideal para la inmunoterapia de neoplasias malignas de linfocitos B, ya que se expresa en la superficie de linfocitos B y es casi específico de estas células. CD19 se expresa más ampliamente que CD20 en linfocitos B durante el desarrollo de los linfocitos B, por lo que típicamente una célula positiva para CD20 también expresará CD19. Durante la diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas (células secretoras de anticuerpos), los linfocitos B regulan por disminución la expresión de CD20. A veces, los linfomas de linfocitos B también regulan por disminución la expresión de CD20, pero siguen siendo positivos para CD19. Por lo tanto, dirigirse tanto a CD19 como a CD20 cubriría ampliamente los linfocitos B enfermos en linfomas, lo que también podría desviar la presión selectiva desde CD20 tanto a CD19 como a CD20. Aunque se desconoce si CD19 contribuye directamente a la carcinogénesis de los linfocitos B, su expresión se conserva muy bien en la mayoría de los tumores de linfocitos B, tales como las leucemias linfocíticas agudas (LLA), las leucemias linfocíticas crónicas (LLC) y los linfomas de linfocitos B. En las leucemias agudas, CD19 se expresa de manera constante y continua en casi todos los subtipos, mientras que solo un pequeño número de leucemias expresan CD20.

Se ha descubierto que se logra un efecto antitumoral máximo del agonismo de 4-1BB cuando la molécula de unión a antígeno 4-1BBL dirigida a CD19 se combina con un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3, es decir, un anticuerpo biespecífico de linfocitos T CD20. El anticuerpo biespecífico de linfocitos T proporciona a los linfocitos T la señalización inicial para la activación de RLT y, a continuación, la combinación con CD19-4-1BBL da lugar a un refuerzo adicional de la inmunidad antitumoral de los linfocitos T. Por tanto, en el presente documento se describe una nueva politerapia para el cáncer con neoplasia maligna de linfocitos B.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos anti-CD20/anti-CD3 y a su uso en combinación con agonistas de 4-1BB (CD137), en particular agonistas de 4-1BB (CD137) que comprenden al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19, en particular al trimero de 4-1BBL que contiene moléculas de unión a antígeno, en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, más en particular para tratar o retrasar la progresión de trastornos proliferativos de linfocitos B. Se ha descubierto que la politerapia descrita en el presente documento es más eficaz para inhibir el crecimiento tumoral y eliminar las células tumorales que el tratamiento con los anticuerpos biespecíficos anti-CD20/anti-CD3 solos.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 se combina con un agonista de 4-1BB (CD137) que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19, en particular a un agonista de 4-1BB que comprende tres ectodomios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19.

En particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19. En un aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc. En un aspecto particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc con modificaciones que reducen o preferentemente eliminan la unión al receptor de Fcγ y/o la función efectora.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento

- para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y el agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 se administran juntos en una única composición o se administran por separado en dos o más composiciones diferentes.
- 5 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 se administra al mismo tiempo que, antes de o posteriormente al agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19.
- 10 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos. En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y en el que los ectodominios de 4-1BBL comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8; en particular la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5. Más en particular, los ectodominios de 4-1BBL comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.
- 15 20 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19. En un aspecto, la molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente al CD19 no será internalizada por linfocitos B que expresan CD19. En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos, y al menos un resto que se puede unir específicamente a CD19, en el que el dominio de unión al antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende
- 25 30 (a) una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende: (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, o
- 35 40 (b) una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende (i) CDR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, (ii) CDR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y (iii) CDR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19), que comprende (iv) CDR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, (v) CDR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, y (vi) CDR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 45 50 En un aspecto particular, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19, en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, o en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. En un aspecto particular, el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.
- 55 60 65 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 es una molécula de unión a antígeno que comprende además un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable. En particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc de IgG, específicamente un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. Más en particular, el agonista

de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora. En un aspecto particular, el agonista de 4-1BB comprende un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G.

5 En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende

- 10 (a) al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19,
 (b) un primer y segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en el que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende

- 20 (a) al menos un dominio Fab que se puede unir específicamente a CD19, y
 (b) un primer y segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que

25 (i) el primer polipéptido contiene un dominio CH1 o CL y el segundo polipéptido contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en el que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido por un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en el que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un conector peptídico, y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o

30 (ii) el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en el que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí y al extremo C del dominio CH3 por un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico al extremo C del dominio CH3 de dicho polipéptido, o

35 (iii) el primer polipéptido contiene un dominio VH-CL o un dominio VL-CH1 y el segundo polipéptido contiene un dominio VL-CH1 o un dominio VH-CL, respectivamente, en el que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido por un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en el que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí y al VH o VL mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico a VL o VH de dicho polipéptido.

45 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende

50 (a) al menos un dominio Fab que se puede unir específicamente a CD19 que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, y

55 (b) un primer y segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32; y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

60 En un aspecto particular, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno seleccionada del grupo que consiste en

- 5 a) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;
- 10 b) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;
- 15 c) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40;
- 20 d) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;
- 25 e) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44;
- 30 f) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;
- 35 g) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;
- 40 h) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;
- 45 i) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50;
- j) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;
- 50 k) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y
- 55 l) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52.
- 60 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende
- 65 (a) al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19,
- (b) un polipéptido que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí mediante conectores peptídicos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende

- 5 (a) al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19,
 - (b) un polipéptido que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí mediante conectores peptídicos, y
 - 10 (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable, en el que el polipéptido que comprende los tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí mediante conectores peptídicos se fusiona con el aminoácido N o C terminal de una de las dos subunidades del dominio Fc, opcionalmente a través de un conector peptídico.
 - 15 En un aspecto particular, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno seleccionada del grupo que consiste en
 - 20 (a) una molécula que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53,
 - 25 (b) una molécula que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53;
 - 30 (c) una molécula que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, y
 - 35 (d) una molécula que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el agonista de 4-1BB es un anticuerpo biespecífico anti-CD19/anti-4-1BB.
- En todos estos aspectos, la invención proporciona además un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20. En particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD3) y una región variable de la cadena ligera (V_L CD3) y un segundo dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD20) y una región variable de la cadena ligera (V_L CD20). En un aspecto, el primer dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD3) que comprende la secuencia CDR-H1 de SEQ ID NO: 56, la secuencia CDR-H2 de SEQ ID NO: 57 y la secuencia CDR-H3 de SEQ ID NO: 58; y/o una región variable de la cadena ligera (V_L CD3) que comprende la secuencia CDR-L1 de SEQ ID NO: 59, la secuencia CDR-L2 de SEQ ID NO: 60 y la secuencia CDR-L3 de SEQ ID NO: 61. Más en particular, el primer dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y/o una región variable de la cadena ligera (V_L CD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En otro aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD20) que comprende la secuencia CDR-H1 de SEQ ID NO: 64, la secuencia CDR-H2 de SEQ ID NO: 65 y la secuencia CDR-H3 de SEQ ID NO: 66 y/o una región variable de la cadena ligera (V_L CD20) que comprende la secuencia CDR-L1 de SEQ ID NO: 67, la secuencia CDR-L2 de SEQ ID NO: 68 y la secuencia CDR-L3 de SEQ ID NO: 69. Más en particular, el segundo dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD20) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y/o una región variable de la cadena ligera (V_L CD20) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.
- 65 En otro aspecto, la invención proporciona además un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-

- CD3 comprende además un tercer dominio de unión a antígeno que se une a CD20. En particular, el tercer dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada ($V_{H}CD20$) que comprende la secuencia CDR-H1 de SEQ ID NO: 64, la secuencia CDR-H2 de SEQ ID NO: 65 y la secuencia CDR-H3 de SEQ ID NO: 66; y/o una región variable de la cadena ligera ($V_{L}CD20$) que comprende la secuencia CDR-L1 de SEQ ID NO: 67, la secuencia CDR-L2 de SEQ ID NO: 68 y la secuencia CDR-L3 de SEQ ID NO: 69. Más en particular, el tercer dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada ($V_{H}CD20$) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y/o una región variable de la cadena ligera ($V_{L}CD20$) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.
- 5 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el primer dominio de unión a antígeno es una molécula cross-Fab en la que los dominios variables o los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de Fab se intercambian, y el segundo y tercer dominio de unión a antígeno, si está presente, es una molécula Fab convencional.
- 10 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que (i) el segundo dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer dominio de unión a antígeno, el primer dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y el tercer dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc, o (ii) el primer dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo dominio de unión a antígeno, el segundo dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y el tercer dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc.
- 15 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que (i) el segundo dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer dominio de unión a antígeno, el primer dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y el tercer dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc, o (ii) el primer dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc, y el segundo dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y el tercer dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc.
- 20 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un dominio Fc que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora. Más en particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G.
- 25 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 se usa en combinación con un agonista de 4-1BB (CD137) que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19, y en el que la combinación se administra en intervalos de aproximadamente una semana a tres semanas.
- 30 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 se usa en combinación con un agonista de 4-1BB (CD137) que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19, y en el que la combinación se administra en intervalos de aproximadamente una semana a tres semanas.
- 35 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 se usa en combinación con un agonista de 4-1BB (CD137) que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19, y en el que la combinación se administra en intervalos de aproximadamente una semana a tres semanas.
- 40 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 se usa en combinación con un agonista de 4-1BB (CD137) que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19, y en el que se realiza un pretratamiento con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferentemente obinutuzumab, antes de la politerapia, en el que el período de tiempo entre el pretratamiento y la politerapia es suficiente para la reducción de linfocitos B en el individuo en respuesta al anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferentemente obinutuzumab.
- 45 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 se usa en combinación con un agonista de 4-1BB (CD137) que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 y en el que además se administra un anticuerpo contra PD1 o PD-L1, preferentemente atezolizumab.
- 50 En otro aspecto, la invención proporciona un producto farmacéutico que comprende (A) una primera composición que comprende como ingrediente activo un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (B) una segunda composición que comprende como ingrediente activo un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento combinado, secuencial o simultáneo de una enfermedad, en particular para el tratamiento del cáncer.
- 55 En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19. En particular, la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento de trastornos proliferativos de linfocitos B, en particular una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de zona marginal

(LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH).

En un aspecto adicional, la invención proporciona un kit para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un sujeto, que comprende un envase que comprende (A) una primera composición que comprende como ingrediente activo

5 un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable; (B) una segunda composición que comprende como ingrediente activo un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (C) instrucciones para el uso de las composiciones en una politerapia.

10 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una combinación de un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 en la fabricación de un medicamento para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad proliferativa, en particular el cáncer.

15 En particular, se proporciona el uso de una combinación de un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de zona marginal

20 (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH).

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD20/anti-CD3 y de un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente

25 a CD19. En particular, la invención se refiere a un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un sujeto, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19. En un aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc. En un aspecto particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc con modificaciones que reducen la unión al receptor de Fc y/o la función efectora. En un aspecto particular, el agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 es una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos. Más en particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19.

30 35 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD20/anti-CD3 y del agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y el agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 se administran juntos en una sola composición o se administran por separado en dos o más composiciones diferentes. En particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y el agonista de 4-1BB (CD137) que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 se administran por vía intravenosa o subcutánea. En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 se administra al mismo tiempo que, antes de o posteriormente al agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19.

Breve descripción de los dibujos

50 La **figura 1** muestra moléculas de unión a antígeno CD19-4-1BBL particulares y un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 particular, como se usan en los ejemplos. Estas moléculas se describen con más detalle en los ejemplos 1 y 2, respectivamente. El punto negro grueso representa la modificación de botón en ojal. * simboliza modificaciones de aminoácidos en el dominio CH1 y CL (los llamados residuos cargados). La figura 1A muestra una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de 4-1BBL dirigido a CD19 monovalente con modificaciones en el dominio CH1 y CL contiguo al dímero de 4-1BBL y al monómero de 4-1BBL. Como comprendía la proteína de unión específica para CD19 8B8-018, se denominó en el presente documento mono CD19(018)-4-1BBL. La construcción mostrada en la figura 1B difiere de la 1A en que comprende la proteína de unión específica para CD19 8B8-2B11 y, por tanto, se denominó mono-CD19(2B11)-4-1BBL. La figura 1C muestra la construcción bivalente con la proteína de unión CD19(018), denominada bi-CD19(018)-4-1BBL. En la figura 1D se muestra un anticuerpo anti-CD20/anti-CD3 biespecífico ejemplar en formato 2+1 (denominado TCB CD20). Las figuras 1E y 1F muestran moléculas de control no dirigidas (la proteína de unión específica para CD19 se ha reemplazado por un Fab de DP47 que no se une).

55 60 65 En la **figura 2A** se muestra la unión de mono-CD19(018)-4-1BBL a linfocitos B humanos CD19⁺, detectada por un anticuerpo secundario contra Fc humano. En comparación con la construcción no dirigida, el monoCD19(018)-4-1BBL presenta una fuerte unión a linfocitos B humanos CD19⁺ de una manera dependiente de la dosis. La

disminución de la expresión de CD19 en los linfocitos B después de la unión por mono-CD19(018)-4-1BBL se ilustra en la **figura 2B**, lo que indica que la unión es específica para CD19. La **figura 2C** muestra la unión de diferentes construcciones de CD19-4-1BBL a líneas celulares CD19⁺ WSU-DLCL2, detectada por el anticuerpo secundario contra Fc humano. Se muestra que las construcciones de CD19-4-1BBL monovalentes demostraron una mejor unión a las células que la construcción de CD19-4-1BBL bivalente.

Las **figuras 3A y 3B** muestran la unión de mono- y bi-CD19(018)-4-1BBL a 4-1BBL a linfocitos T CD4 activados (figura 3A) o linfocitos T CD8 activados (figura 3B). Los PBMC humanos totales se preactivaron mediante microesferas anti-CD3 y anti-CD28 para que se acoplaran con RLT en los linfocitos T (CD4 y CD8). Los linfocitos T activados regularon por incremento 4-1BB. Dos días más tarde, las células se extrajeron y coincubaron en hielo con una concentración titulada de CD19-4-1BBL para la unión a 4-1BB en linfocitos T. La unión específica fue detectada por el anticuerpo secundario contra Fc de IgG humana.

En la **figura 4** se muestra la liberación de IFN-γ por PBMC activados causada por mono- o bi-CD19(018)-4-1BBL. Se incubaron PBMC humanos totales con microesferas anti-CD3 y anti-CD28 y una concentración titulada de CD19-4-1BBL. Dos días después, se recogieron los sobrenadantes para la medición de IFN-γ mediante ELISA.

La **figura 5** muestra una visualización de la localización dinámica de anticuerpos mediante microscopía confocal de fluorescencia. Un análisis realizado a lo largo del tiempo mostró que la molécula CD19-41BBL (mostrada en blanco) se polariza hacia el sitio de interacción del linfocito T/célula tumoral en presencia de 500 ng/ml de TCB CD20 CD3 y no cuando se usaron 5 ng/ml de TCB CD20 CD3, como se ve en instantáneas de linfocitos T en contacto con células tumorales en tres puntos temporales diferentes (figura 5A). La CD19-41BBL marcada se cuantificó a lo largo del tiempo (figura 5B), lo que mostró una localización estable de CD19-4-1BBL en el sitio de interacción de una manera dependiente de la dosis.

La **figura 6** se refiere a la internalización de construcciones de CD19-4-1BBL por células tumorales WSU. El clon BU12, un anticuerpo anti-CD19, se internalizó rápidamente en la célula tumoral, mientras que las CD19-4-1BBL no se internalizaron en las células tumorales y, por tanto, mantuvieron su capacidad de interacción con el microambiente tumoral.

La **figura 7** muestra el perfil farmacocinético de dosis única (SDPK) de mono- y bi-CD19(018)-4-1BBL y mono-CD19(2B11)-4-1BBL en ratones NOD/Shi-scid/IL-2R^ynull (NOG) inmunodeficientes. Como se puede ver en los gráficos, todas las moléculas revelaron un perfil PK estable y similar a IgG.

La **figura 8** muestra el protocolo del estudio de eficacia *in vivo* de las construcciones mono- frente a las bi-CD19(018)-4-1BBL, en combinación con TCB CD20 en ratones NOG completamente humanizados portadores de WSU-DLCL2. En la tabla a continuación se definen los subgrupos de ratones que reciben diferentes combinaciones y dosis. El experimento se describe en el ejemplo 5b y los resultados se muestran en las **figuras 9A y 9B**. La combinación de mono-CD19(018)-4-1BBL en combinación con TCB CD20 no solo indujo una inhibición del crecimiento tumoral más fuerte y más rápida en comparación con la monoterapia con TCB CD20, sino que también fue superior a la combinación de bi-CD19(018)-4-1BBL o mono-4-1BBL no dirigido y TCB CD20, en todas las dosis sometidas a prueba. Como se muestra en la **figura 9B**, los pesos tumorales al final del estudio confirmaron estos hallazgos; sin embargo, se observan diferencias notables en términos de inhibición del crecimiento tumoral en la cinética del crecimiento tumoral, especialmente en puntos temporales anteriores (**figura 9A**). Estos datos sugieren que la unión monovalente a CD19 (mono-CD19(018)-4-1BBL) es superior a la bivalente en términos de inhibición del crecimiento tumoral cuando se combina con TCB CD20.

En la **figura 10** se muestra la comparación de la eficacia *in vivo* de las construcciones mono-CD19(018)-4-1BBL frente a las mono-CD19(2B11)-4-1BBL en combinación con TCB CD20 en ratones NOG completamente humanizados portadores de WSU-DLCL2. Se muestra el protocolo de este estudio y en la tabla a continuación se definen los subgrupos de ratones que reciben diferentes combinaciones. Los resultados de este estudio se ilustran en las **figuras 11A y 11B**. Tanto la combinación de mono-CD19(018)-4-1BBL como de mono-CD19(2B11)-4-1BBL con TCB CD20 indujeron una inhibición potenciada y más rápida del crecimiento tumoral, en comparación con la monoterapia de TCB CD20. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los dos clones de la proteína de unión específica para CD19. Ambas moléculas son comparables en el refuerzo de la inhibición del crecimiento tumoral mediada por TCB CD20.

Los datos de inmunofarmacodinámica (PD) de tumores de animales (exploradores) sacrificados el día 20 del estudio se muestran en las **figuras 12A, 12B y 12C**. Los datos revelaron una infiltración intratumoral potenciada de linfocitos T humanos (figura 12A), un cambio en las proporciones CD8/CD4 (figura 12B) y en las proporciones CD8/Treg (figura 12C) hacia las células CD8 en ambos grupos de combinación, en comparación con TCB CD20 solo o tumores vehiculares. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los dos grupos en cuanto a la combinación de TCB CD20 ya sea con mono-CD19(018)-4-1BBL o con mono-CD19(2B11)-4-1BBL.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**Definiciones**

- 5 A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se usa en general en la técnica a la que pertenece la presente invención. Para propósitos de interpretación de esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando corresponda, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa.
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "**molécula de unión a antígeno**" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Ejemplos de moléculas de unión a antígeno son anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y proteínas de unión a antígeno supercónigos.
- 15 El término "**anticuerpo**" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos y multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.
- 20 El término "**anticuerpo monoclonal**", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades insignificantes. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos frente a diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno.
- 25
- 30 El término anticuerpo "**monoespecífico**", como se usa en el presente documento, indica un anticuerpo que tiene uno o más sitios de unión, cada uno de los cuales se une al mismo epítopo del mismo antígeno. El término "**biespecífica**" quiere decir que la molécula de unión a antígeno se puede unir específicamente a al menos dos determinantes antigenicos distintos. Típicamente, una molécula de unión a antígeno biespecífica comprende dos sitios de unión a antígeno, cada uno de los cuales es específico para un determinante antigenico diferente. En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica se puede unir simultáneamente a dos determinantes antigenicos, en particular dos determinantes antigenicos expresados en dos células distintas.
- 35 El término "**Valente**", como se usa en la presente solicitud, indica la presencia de un número específico de sitios de unión en una molécula de unión a antígeno. Como tales, los términos "bivalente", "tetravalente" y "hexavalente" indican la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente, en una molécula de unión a antígeno.
- 40 Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo inalterado" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural. "**Anticuerpos naturales**" se refieren a moléculas de inmunoglobulina naturales con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos de clase IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras y
- 45 dos cadenas pesadas que se unen mediante enlaces disulfuro. Desde el extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio variable pesado o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también llamados regiones constantes de la cadena pesada. De forma similar, desde el extremo N al extremo C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio variable ligero o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio
- 50 constante ligero (CL), también llamado región constante de la cadena ligera. La cadena pesada de un anticuerpo se puede asignar a uno de los cinco tipos, llamados α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), algunos de los cuales se pueden dividir en subtipos, por ejemplo, γ_1 (IgG1), γ_2 (IgG2), γ_3 (IgG3), γ_4 (IgG4), α_1 (IgA1) y α_2 (IgA2). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.
- 55 Un "**fragmento de anticuerpo**" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, fragmentos cross-Fab; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv) y anticuerpos de dominio único. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plückthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítopos de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos, véanse, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, Nat. Med. 9, 129-

- 134 (2003); y Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una parte del dominio variable de la cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo pero sin limitarse a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.
- 10 La digestión con papaína de anticuerpos intactos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab" que contienen cada uno los dominios variables de la cadena pesada y ligera y también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Por tanto, como se usa en el presente documento, un "**fragmento Fab**" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un fragmento de cadena ligera que comprende un dominio VL y un dominio constante de una cadena ligera (CL), y un dominio VH y un primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH son fragmentos Fab' en los que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes contienen un grupo tiol libre. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígenos (dos fragmentos Fab) y una parte de la región Fc.
- 15 El término "**fragmento cross-Fab**" o "fragmento xFab" o "fragmento Fab de entrecruzamiento" se refiere a un fragmento Fab, en el que se intercambian las regiones variables o las regiones constantes de la cadena pesada y ligera. Son posibles dos composiciones de cadena diferentes de una molécula Fab de entrecruzamiento y están comprendidas en los anticuerpos biespecíficos de la invención: por una parte, se intercambian las regiones variables de la cadena pesada y ligera de Fab, es decir, la molécula Fab de entrecruzamiento comprende una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena ligera (VL) y la región constante de la cadena pesada (CH1), y una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena pesada (VH) y la región constante de la cadena ligera (CL). Esta molécula Fab de entrecruzamiento también se denomina CrossFab_(VLVH).
- 20 Por otra parte, cuando se intercambian las regiones constantes de la cadena pesada y ligera de Fab, la molécula Fab de entrecruzamiento comprende una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena pesada (VH) y la región constante de la cadena ligera (CL), y una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena ligera (VL) y la región constante de la cadena pesada (CH1). Esta molécula Fab de entrecruzamiento también se denomina CrossFab_(CLCH1).
- 25 35 Un "fragmento Fab monocatenario" o "**scFab**" es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, un dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo, un dominio constante de la cadena ligera (CL) de anticuerpo y un conector, en el que dichos dominios de anticuerpo y dicho conector tienen uno de los siguientes órdenes en sentido N terminal a C terminal:
- 40 a) VH-CH1-conector-VL-CL, b) VL-CL-conector-VH-CH1, c) VH-CL-conector-VL-CH1 o d) VL-CH1-conector-VH-CL; y en el que dicho conector es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos, preferentemente entre 32 y 50 aminoácidos. Dichos fragmentos Fab monocatenarios se estabilizan por medio del enlace disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1. Además, se podrían estabilizar adicionalmente estas moléculas Fab monocatenarias mediante la generación de enlaces disulfuro intercatenarios por medio de la inserción de residuos de cisteína (por ejemplo, en la posición 44 de la cadena pesada variable y la posición 100 de la cadena ligera variable de acuerdo con la numeración de Kabat).
- 45 50 Un "fragmento Fab monocatenario de entrecruzamiento" o "**x-scFab**" es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, un dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo, un dominio constante de la cadena ligera (CL) de anticuerpo y un conector, en el que dichos dominios de anticuerpo y dicho conector tienen uno de los siguientes órdenes en sentido N terminal a C terminal: a) VH-CL-conector-VL-CH1 y b) VL-CH1-conector-VH-CL; en el que VH y VL forman juntos un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno y en el que dicho conector es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos. Además, se podrían estabilizar adicionalmente estas moléculas x-scFab mediante la generación de enlaces disulfuro intercatenarios por medio de la inserción de residuos de cisteína (por ejemplo, en la posición 44 de la cadena pesada variable y la posición 100 de la cadena ligera variable de acuerdo con la numeración de Kabat).
- 55 60 Un "**fragmento variable monocatenario (scFv)**" es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de un anticuerpo, conectada con un conector peptídico corto de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. El conector es normalmente rico en glicina para aportar flexibilidad, así como en serina o treonina para aportar solubilidad, y puede conectar el extremo N de V_H con el extremo C de V_L, o viceversa. Esta proteína conserva la especificidad del anticuerpo original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del conector. Los anticuerpos scFv se describen, por ejemplo, en Houston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-96). Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos monocatenarios que tienen las características de un dominio VH, a saber, que se pueden ensamblar junto con un

dominio VL, o de un dominio VL, a saber, que se pueden ensamblar junto con un dominio VH a un sitio de unión a antígeno funcional y que proporcionan, de este modo, la propiedad de unión a antígeno de los anticuerpos de longitud completa.

- 5 Las “**proteínas de unión a antígeno supercónigo**” son conocidas en la técnica, por ejemplo, la fibronectina y las proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) se han usado como supercónigos alternativos para los dominios de unión a antígeno, véase, por ejemplo, Gebauer y Skerra, Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol 13:245-255 (2009) y Stumpp *et al.*, Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today 13: 695-701 (2008). En un aspecto de la invención, una 10 proteína de unión a antígeno supercónigo se selecciona del grupo que consiste en CTLA-4 (Evobody), Lipocalinas (Anticalin), una molécula derivada de la proteína A tal como el dominio Z de la proteína A (Affibody), un dominio A (Avimer/Maxibody), una transferrina sérica (cuerpo *trans*); una proteína de repetición de anquirina diseñada (DARPin), un dominio variable de la cadena ligera o cadena pesada del anticuerpo (anticuerpo de dominio único, sdAb), un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo (nanocuerpo, aVH), fragmentos V_{NAR}, una 15 fibronectina (AdNectin), un dominio de lectina de tipo C (transefectina); un dominio variable de un nuevo receptor de antígeno beta-lactamasa (fragmentos V_{NAR}), una gamma-cristalina o ubiquitina (moléculas de Affilin) humanas; un dominio de tipo kunitz de inhibidores de la proteasa humana, microcuerpos tales como las proteínas de la familia knottin, aptámeros peptídicos y fibronectina (adnectina).
- 20 Las lipocalinas son una familia de proteínas extracelulares que transportan pequeñas moléculas hidrófobas tales como esteroides, bilinas, retinoides y lípidos. Tienen una estructura secundaria rígida de lámina beta con una serie de bucles en el extremo abierto de la estructura cónica que se pueden genomanipular para unirse a diferentes antígenos diana. Las anticalinas tienen un tamaño que oscila entre 160 y 180 aminoácidos y se derivan de las lipocalinas. Para más detalles, véase Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000), los documentos US7250297B1 y US20070224633.
- 25 Las proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) se derivan de la anquirina, que es una familia de proteínas que interviene en la unión de proteínas de membrana integrales al citoesqueleto. Una sola repetición de anquirina es un motivo de 33 residuos que consiste en dos hélices alfa y un giro beta. Se pueden genomanipular para que se unan a diferentes antígenos diana aleatorizando los residuos en la primera hélice alfa y un giro beta de cada repetición. Su interfaz de enlace se puede incrementar al incrementar el número de módulos (un procedimiento de maduración por afinidad). Para más detalles, véase J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) y J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) y el documento US20040132028A1.
- 30 35 Un anticuerpo de dominio único es un fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio de anticuerpo variable monomérico único. Los primeros dominios únicos se derivaron del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de camélidos (nanocuerpos o fragmentos V_{HH}). Además, el término anticuerpo de dominio único incluye un dominio variable de la cadena pesada humana autónomo (aVH) o fragmentos V_{NAR} derivados de los tiburones.
- 40 45 Una “**molécula de unión a antígeno que se une al mismo epítop**” que una molécula de referencia se refiere a una molécula de unión a antígeno que bloquea la unión de la molécula de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más y, a la inversa, la molécula de referencia bloquea la unión de la molécula de unión a antígeno a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más.
- 50 55 El término “**dominio de unión a antígeno**” se refiere a la parte de una molécula de unión a antígeno que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria a parte o la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, una molécula de unión a antígeno solo se puede unir a una parte particular del antígeno, denominándose dicha parte epítopo. Se puede proporcionar un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, por uno o más dominios variables (también llamados regiones variables). Preferentemente, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH).
- 60 65 Como se usa en el presente documento, el término “**determinante antigénico**” es sinónimo de “antígeno” y “epítopo” y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional constituida por diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une un resto de unión a antígeno, formando un complejo resto de unión a antígeno-antígeno. Se pueden encontrar determinantes antigénicos útiles, por ejemplo, en las superficies de células tumorales, en las superficies de células infectadas por virus, en las superficies de otras células afectadas, en la superficie de células inmunitarias, libres en suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (ECM). Las proteínas útiles como antígenos en el presente documento pueden ser cualquier forma natural de las proteínas de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. En un modo de realización particular, el antígeno es una proteína humana. Cuando se hace referencia a una proteína específica en el presente documento, el término engloba la proteína no procesada “de longitud completa”, así como cualquier forma de la proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de la proteína, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas.

Por “**unión específica**” se quiere decir que la unión es selectiva para el antígeno y se puede discriminar de las interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de una molécula de unión a antígeno para unirse a un antígeno específico se puede medir mediante un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas familiares para un experto en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) (analizada en un instrumento BIACore) (Liljeblad *et al.*, Glyco J 17, 323-329 (2000)), y ensayos de saturación tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En un modo de realización, el grado de unión de una molécula de unión a antígeno con una proteína no relacionada es inferior a aproximadamente un 10 % de la unión de la molécula de unión a antígeno medida, por ejemplo, mediante SPR. En determinados modos de realización, una molécula que se une al antígeno tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$, $\leq 0,1 \text{nM}$, $\leq 0,01 \text{nM}$ o $\leq 0,001 \text{nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

“**Afinidad**” o “afinidad de unión” se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un sitio de unión único de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañera Y se puede representar en general por la constante de disociación (K_d), que es la proporción de las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_{dis} y k_{as} , respectivamente). Por tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre que la proporción de las constantes de velocidad permanezca igual. Se puede medir la afinidad por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Un procedimiento particular para medir la afinidad es la resonancia de plasmón superficial (SPR).

Un “**antígeno de linfocitos B**” como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico presentado en la superficie de un linfocito B, en particular un linfocito B maligno (en ese caso, el antígeno también se denomina “antígeno de linfocitos B malignos”).

El término “**CD19**” se refiere al antígeno de linfocitos B CD19, también conocido como antígeno de superficie de linfocitos B B4 o antígeno de superficie de linfocitos T Leu-12, e incluye cualquier CD19 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos), primates no humanos (por ejemplo, macacos cangrejeros) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. La secuencia de aminoácidos del CD19 humano se muestra en el n.º de acceso de Uniprot P15391 (versión 160, SEQ ID NO: 80). El término engloba el CD19 humano no procesado de “longitud completa”, así como cualquier forma de CD19 humano que resulte del procesamiento en la célula siempre que el anticuerpo como se informa en el presente documento se una a él. El CD19 es un receptor de superficie celular estructuralmente distinto, expresado en la superficie de los linfocitos B humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, prelinfocitos B, linfocitos B en desarrollo temprano (es decir, linfocitos B inmaduros), linfocitos B maduros a través de la diferenciación terminal en células plasmáticas y linfocitos B malignos. El CD19 se expresa en la mayoría de las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) linfomas no Hodgkin, leucemias linfocíticas crónicas (LLC) de linfocitos B, leucemias prolinfocíticas, tricoleucemias, leucemias linfocíticas agudas comunes y algunas leucemias linfoblásticas agudas de linfocitos nulos. La expresión de CD19 en células plasmáticas sugiere además que se puede expresar en tumores de linfocitos B diferenciados, tales como el mieloma múltiple. Por lo tanto, el antígeno CD19 es una diana para la inmunoterapia en el tratamiento del linfoma no Hodgkin, la leucemia linfocítica crónica y/o la leucemia linfoblástica aguda.

“**CD20**” se refiere al antígeno de linfocitos B CD20, también conocido como antígeno de superficie de linfocitos B B1 o antígeno de superficie de leucocitos Leu-16, e incluye cualquier CD20 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos), primates no humanos (por ejemplo, macacos cangrejeros) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. La secuencia de aminoácidos del CD20 humano se muestra en el n.º de acceso de Uniprot P11836 (versión 149, SEQ ID NO: 81). El CD20 es una proteína transmembranaria hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD expresada en prelinfocitos B y linfocitos B maduros. El gen humano correspondiente es el miembro de la subfamilia A de 4 dominios que atraviesa la membrana 1, también conocido como MS4A1. Este gen codifica un miembro de la familia de genes 4A que atraviesa la membrana. Los miembros de esta familia de proteínas activas se caracterizan por rasgos característicos estructurales comunes y límites de empalme intrones/exones similares y presentan patrones de expresión únicos entre células hematopoyéticas y tejidos no linfáticos. Este gen codifica la molécula de superficie de linfocitos B que desempeña un papel en el desarrollo y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas. Este miembro de la familia se localiza en 11q12, entre una agrupación de miembros de la familia. El empalme alternativo de este gen da como resultado dos variantes de transcripción que codifican la misma proteína. El término “CD20” engloba el CD20 no procesado “de longitud completa”, así como cualquier forma de CD20 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de CD20, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas.

Los términos “**anticuerpo anti-CD20**” y “un anticuerpo que se une a CD20” se refieren a un anticuerpo que se puede unir a CD20 con una afinidad suficiente, de modo que el anticuerpo sea útil como agente diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a CD20. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-CD20 a una

proteína distinta de CD20 no relacionada es inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a CD20 medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une a CD20 tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$, $\leq 0,1 \text{nM}$, $\leq 0,01 \text{nM}$ o $\leq 0,001 \text{nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-CD20 se une a un epítopo de CD20 que está conservado entre CD20 de especies diferentes.

Por "anticuerpo anti-CD20 de tipo II" se quiere decir un anticuerpo anti-CD20 que tiene las propiedades de unión y actividades biológicas de los anticuerpos anti-CD20 de tipo II, como se describe en Cragg *et al.*, Blood 103 (2004) 2738-2743; Cragg *et al.*, Blood 101 (2003) 1045-1052, Klein *et al.*, MAbs 5 (2013), 22-33, y se resumen en la tabla 1 a continuación.

TABLA A. Propiedades de los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II

anticuerpos anti-CD20 de tipo I	anticuerpos anti-CD20 de tipo II
Se unen al epítopo CD20 de clase I	Se unen al epítopo CD20 de clase II
Localizan CD20 en balsas lipídicas	No localizan CD20 en balsas lipídicas
CDC alto *	CDC bajo *
Actividad ADCC *	Actividad ADCC *
Capacidad de unión total a los linfocitos B	Aprox. la mitad de la capacidad de unión a los linfocitos B
Agregación homotípica débil	Agregación homotípica
Baja inducción de muerte celular	Fuerte inducción de muerte celular

* en caso del isótopo IgG₁

Los ejemplos de anticuerpos anti-CD20 de tipo II incluyen, por ejemplo, obinutuzumab (GA101), tositumumab (B1), anticuerpo IgG1 B-Ly1 humanizado (un anticuerpo IgG1 humanizado químérico como se divulga en el documento WO 2005/044859), IgG1 11B8 (como se divulga en el documento WO 2004/035607) e IgG1 AT80.

En un aspecto, el anticuerpo anti-CD20 de tipo II comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VHCD20) de SEQ ID NO: 70 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera (VLCD20) de SEQ ID NO: 71. En otro aspecto, el anticuerpo anti-CD20 de tipo II se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. En un aspecto, al menos aproximadamente el 40 % de los oligosacáridos unidos a N en la región Fc del anticuerpo anti-CD20 de tipo II no están fucosilados.

En un aspecto particular, el anticuerpo anti-CD20 de tipo II es obinutuzumab (DCI recomendada, WHO Drug Information, vol. 26, n.º 4, 2012, pág. 453). Como se usa en el presente documento, obinutuzumab es sinónimo de GA101. El nombre comercial es GAZYVA® o GAZYVARO®. Este sustituye a todas las versiones anteriores (por ejemplo, vol. 25, n.º 1, 2011, págs. 75 y 76), y se conoce anteriormente como afutuzumab (DCI recomendada; WHO Drug Information, vol. 23, n.º 2, 2009, pág. 176; vol. 22, n.º 2, 2008, pág. 124). En un modo de realización, el anticuerpo anti-CD20 de tipo II comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10; y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 11. En un aspecto, el anticuerpo anti-CD20 de tipo I es tositumomab.

Los ejemplos de anticuerpos anti-CD20 de tipo I incluyen, por ejemplo, rituximab, ofatumumab, veltuzumab, ocaratuzumab, ocrelizumab, PRO131921, ublituximab, IgG3 H147 (ECACC, hibridoma), IgG1 2C6 (como se divulga en el documento WO 2005/103081), IgG1 2F2 (como se divulga en los documentos WO 2004/035607 y WO 2005/103081) e IgG1 2H7 (como se divulga en el documento WO 2004/056312).

El término "anticuerpo B-Ly1 humanizado" se refiere a un anticuerpo B-Ly1 humanizado, como se divulga en los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875, que se obtuvo a partir del anticuerpo anti-CD20 monoclonal murino B-Ly1 (región variable de la cadena pesada (VH) murina: SEQ ID NO:82; región variable de la cadena ligera (VL) murina: SEQ ID NO:83 (véase Poppema, S. y Visser, L., Biotest Bulletin 3 (1987) 131-139) mediante quimerización con un dominio constante humano de IgG1 y seguido de humanización (véanse los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). Estos "anticuerpos B-Ly1 humanizados" se divulgán en detalle en los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875.

El término "reducción" (y variaciones gramaticales del mismo tales como "reducir" o "que reduce"), por ejemplo reducción del número de linfocitos B o liberación de citocinas, se refiere a una disminución en la cantidad respectiva, medida por procedimientos apropiados conocidos en la técnica. Para mayor claridad, el término incluye

también la reducción a cero (o por debajo del límite de detección del procedimiento analítico), es decir, la supresión o eliminación completa. Por el contrario, “**incrementado**” se refiere a un incremento en la cantidad respectiva.

5 Un “**antígeno de linfocitos T**”, como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico presentado en la superficie de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico.

10 Un “**agente terapéutico activador de linfocitos T**”, como se usa en el presente documento, se refiere a un agente terapéutico que puede inducir la activación de linfocitos T en un sujeto, en particular un agente terapéutico diseñado para inducir la activación de linfocitos T en un sujeto. Los ejemplos de agentes terapéuticos activadores de linfocitos T incluyen anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a un antígeno de linfocitos T activador, tal como CD3, y a un antígeno de células diana, tal como CD20 o CD19. Otros ejemplos incluyen receptores de antígenos quiméricos (CAR) que comprenden un dominio de activación de linfocitos T y un resto de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de células diana, tal como CD20 o CD19.

15 20 Un “**antígeno activador de linfocitos T**”, como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico expresado por un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, que puede inducir o potenciar la activación de linfocitos T tras la interacción con una molécula de unión a antígeno. Específicamente, la interacción de una molécula de unión a antígeno con un antígeno activador de linfocitos T puede inducir la activación de linfocitos T desencadenando la cascada de señalización del complejo receptor de linfocitos T. Un antígeno de linfocitos T activador ejemplar es CD3.

25 30 El término “**CD3**” se refiere a cualquier CD3 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos), primates no humanos (por ejemplo, macacos cangrejeros) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba el CD3 no procesado “de longitud completa”, así como cualquier forma de CD3 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de CD3, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. En un modo de realización, CD3 es CD3 humano, en particular la subunidad épsilon de CD3 humano (CD3ε). La secuencia de aminoácidos de CD3ε humano se muestra en UniProt (www.uniprot.org), n.º de acceso P07766 (versión 144) o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_000724.1. Véase también la SEQ ID NO: 84. La secuencia de aminoácidos de CD3ε de macaco cangrejero [*Macaca fascicularis*] se muestra en el GenBank de NCBI, n.º BAB71849.1. Véase también la SEQ ID NO: 85.

35 40 El término “**región variable**” o “dominio variable” se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión de la molécula de unión a antígeno al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno.

45 50 55 60 El término “**región hipervariable**” o “HVR”, como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariante y/o forman bucles definidos estructuralmente (“bucle hipervariable”). En general, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden en general residuos de aminoácido de los bucles hipervariables y/o de las “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR), siendo las últimas las de variabilidad de secuencia más alta y/o estando implicadas en el reconocimiento antigenico. Los bucles hipervariables ejemplares se producen en los residuos de aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las CDR ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácido 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Las regiones hipervariables (HVR) también se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR), y estos términos se usan en el presente documento de manera intercambiable en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983) y Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) han descrito esta región particular, donde las definiciones incluyen solapamientos o subconjuntos de residuos de aminoácido cuando se comparan entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo esté dentro del alcance del término como se define y se usa en el presente documento. Los residuos de aminoácido apropiados que engloban las CDR, como se define en cada una de las referencias citadas anteriormente, se exponen a continuación en la tabla B como comparación. Los números de residuos exactos que engloba una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de forma rutinaria los residuos que comprende una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

TABLA B. Definiciones de CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM²
CDR1 VH	31-35	26-32	26-35
CDR2 VH	50-65	52-58	50-58
CDR3 VH	95-102	95-102	95-102
CDR1 VL	24-34	26-32	24-34
CDR2 VL	50-56	50-52	50-56
CDR3 VL	89-97	91-96	89-97

¹ La numeración de todas las definiciones de CDR en la tabla A está de acuerdo con las convenciones de numeración expuestas por Kabat *et al.* (véase a continuación).

5 ² "AbM" con una "b" minúscula como se usa en la tabla A se refiere a las CDR definidas por el programa informático de modelado de anticuerpos "AbM" de Oxford Molecular.

10 Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para las secuencias de la región variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de la región variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en el presente documento, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique de otro modo, las referencias a la numeración de posiciones de residuos de aminoácido específicas en una región variable de anticuerpo están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

15 Con la excepción de la CDR1 en VH, las CDR comprenden en general los residuos de aminoácido que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "residuos determinantes de la especificidad" o "SDR", que son los residuos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de regiones de las 20 CDR llamadas CDR abreviadas o a-CDR. Las a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácido 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)). A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos del dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

25 Como se usa en el presente documento, el término "**afinidad madurada**" en el contexto de moléculas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos) se refiere a una molécula de unión a antígeno que se deriva de una molécula de unión a antígeno de referencia, por ejemplo, por mutación, se une al mismo antígeno, preferentemente se une al mismo epítopo, que el anticuerpo de referencia; y tiene una mayor afinidad por el antígeno que la de la molécula 30 de unión a antígeno de referencia. La maduración de la afinidad en general implica la modificación de uno o más residuos de aminoácido en una o más CDR de la molécula de unión a antígeno. Típicamente, la molécula de unión a antígeno con afinidad madurada se une al mismo epítopo que la molécula de unión a antígeno de referencia inicial.

35 **"Región estructural"** o "FR" se refiere a los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste en general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen, en general, en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

40 Una "**región estructural humana aceptadora**" para los propósitos en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una región estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana, como se define a continuación. Una región estructural humana aceptadora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una 45 región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios aminoacídicos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunos modos de realización, la región estructural humana aceptadora de VL tiene una secuencia idéntica a la secuencia de la región estructural de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia de la región estructural consenso humana.

50 El término anticuerpo "**químérico**" se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

La “**clase**” de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente.

Un anticuerpo “**humanizado**” se refiere a un anticuerpo químérico que comprende residuos de aminoácido de HVR no humanas y residuos de aminoácido de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una “**forma humanizada**” de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización. Otras formas de “anticuerpos humanizados” englobadas por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente con respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en relación a la unión a C1q y/o la unión al receptor de Fc (FcR).

Un anticuerpo “**humano**” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

El término “dominio Fc” o “**región Fc**” en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de anticuerpo que contiene al menos una parte de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Una región Fc de IgG comprende un dominio CH2 de IgG y un dominio CH3 de IgG. El “dominio CH2” de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 231 hasta un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 340. En un modo de realización, una cadena glucídica se une al dominio CH2. El dominio CH2 en el presente documento puede ser un dominio CH2 de secuencia natural o un dominio CH2 variante. El “dominio CH3” comprende el tramo de residuos C terminales hasta un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 341 hasta un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 447 de una IgG). La región CH3 en el presente documento puede ser un dominio CH3 de secuencia natural o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 con una “protuberancia” (“botón”) introducida en una cadena del mismo y una “cavidad” (“ojal”) introducida correspondiente en la otra cadena del mismo; véase la patente de EE. UU. n.º 5.821.333, incorporada expresamente en el presente documento por referencia). Se pueden usar dichos dominios CH3 variantes para promover la heterodimerización de dos cadenas pesadas de anticuerpo no idénticas como se describe en el presente documento. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de residuos de aminoácido en la región Fc o región constante está de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

La tecnología de “**botón en ojal**” se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway *et al.* Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia (“botón”) en la interfase de un primer polipéptido y una correspondiente cavidad (“ojal”) en la interfase de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se puede situar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). La protuberancia y la cavidad se pueden realizar alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, por mutagénesis específica de sitio o por síntesis de péptidos. En un modo de realización específico, una modificación de botón comprende la sustitución aminoacídica T366W en una de las dos subunidades del dominio Fc, y la modificación de ojal comprende las sustituciones aminoacídicas T366S, L368A e Y407V en la otra de las dos subunidades del dominio Fc. En otro modo de realización específico, la subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de botón comprende adicionalmente la sustitución aminoacídica S354C, y la subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de ojal comprende adicionalmente la sustitución aminoacídica Y349C. La introducción de estos dos residuos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc, estabilizando por tanto adicionalmente el dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

Una “**región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina**” pretende incluir variantes alélicas naturales de la

- región Fc de una inmunoglobulina, así como variantes que tienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o delecciones pero que no disminuyen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina para mediar funciones efectoras (tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Por ejemplo, se pueden eliminar uno o más aminoácidos del extremo N o del extremo C de la región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de la función biológica. Dichas variantes se pueden seleccionar de acuerdo con las reglas generales conocidas en la técnica para que tenga un efecto mínimo sobre la actividad (véase, por ejemplo, Bowie, J. U. et al., *Science* 247:1306-10 (1990)).
- El término “**funciones efectoras**” se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión a receptor de Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, captación de antígenos mediada por complejo inmunitario por células presentadoras de antígenos, regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.
- Un “**receptor de Fc activador**” es un receptor de Fc que, después del acoplamiento por una región Fc de un anticuerpo, provoca acontecimientos de señalización que estimulan a la célula que porta el receptor para realizar funciones efectoras. Los receptores Fc activadores incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89). Un receptor de Fc activador particular es FcγRIIIa humano (véase el n.º de acceso de UniProt P08637, versión 141).
- Como se usa en el presente documento, el término “**células efectoras**” se refiere a una población de linfocitos que muestran receptores de restos efectores, por ejemplo, receptores de citocinas, y/o receptores de Fc en su superficie a través de los que se unen a un resto efectivo, por ejemplo, una citocina, y/o una región Fc de un anticuerpo y contribuyen a la destrucción de células diana, por ejemplo, células tumorales. Las células efectoras pueden, por ejemplo, mediar efectos citotóxicos o fagocíticos. Las células efectoras incluyen, pero no se limitan a, linfocitos T efectores tales como linfocitos T citotóxicos CD8+, linfocitos T cooperadores CD4+, linfocitos T γδ, linfocitos NK, linfocitos citolíticos activados por linfocina (LAK) y macrófagos/monocitos.
- Un “**ectodomnio**” es el dominio de una proteína de membrana que se extiende hacia el espacio extracelular (es decir, el espacio fuera de la célula diana). Los ectodominios son normalmente las partes de las proteínas que inician el contacto con las superficies, lo que da lugar a la transducción de señal. El ectodomnio de 4-1BBL, como se define en el presente documento, se refiere por tanto a la parte del 4-1BBL que se extiende hacia el espacio extracelular (el dominio extracelular), pero también incluye partes más cortas o fragmentos de las mismas que son responsables de la trimerización y de la unión al correspondiente receptor 4-1BB. El término “ectodomnio de 4-1BBL o un fragmento del mismo” se refiere por tanto al dominio extracelular de 4-1BBL que forma el dominio extracelular o a partes del mismo que todavía se pueden unir al receptor (dominio de unión al receptor).
- El “**4-1BBL**” o “**ligando de 4-1BB**” o “**CD137L**” es un miembro de la familia de ligandos de FNT coestimuladores, que puede coestimular la proliferación y producción de citocinas de linfocitos T. Los ligandos coestimuladores de la familia del FNT pueden coestimular las señales de RLT al interactuar con sus receptores de FNT correspondientes; y la interacción con sus receptores da lugar al reclutamiento de factores asociados a RFNT (TRAF), que inician cascadas de señalización que dan como resultado la activación de linfocitos T. 4-1BBL es una proteína transmembrana de tipo II. Se ha descrito que el 4-1BBL de longitud completa o total que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 forma trímeros en la superficie de las células. La formación de trímeros está habilitada por motivos específicos del ectodomnio de 4-1BBL. Dichos motivos se denominan en el presente documento “región de trimerización”. Los aminoácidos 50-254 de la secuencia de 4-1BBL humano (SEQ ID NO: 87) forman el dominio extracelular de 4-1BBL, pero incluso fragmentos del mismo pueden formar los trímeros. En modos de realización específicos de la invención, el término “ectodomnio de 4-1BBL o un fragmento del mismo” se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4 (aminoácidos 52-254 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 1 (aminoácidos 71-254 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 3 (aminoácidos 80-254 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 2 (aminoácidos 85-254 de 4-1BBL), SEQ ID NO: 5 (aminoácidos 71-248 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 6 (aminoácidos 85-248 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 7 (aminoácidos 80-248 de 4-1BBL humano) y SEQ ID NO: 8 (aminoácidos 52-248 de 4-1BBL humano), pero también se incluyen en el presente documento otros fragmentos del ectodomnio que se pueden trimerizar.
- El término “**4-1BB**” o “**CD137**”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier 4-1BB natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba el 4-1BB no procesado “de longitud completa”, así como cualquier forma de 4-1BB que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de 4-1BB, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de un 4-1BB humano ejemplar se muestra en la SEQ ID NO: 88 (n.º de acceso de Uniprot Q07011), la secuencia de aminoácidos de un 4-1BB murino ejemplar se muestra en la SEQ ID NO: 89 (n.º de acceso de Uniprot P20334); y la secuencia de aminoácidos de un 4-1BB de macaco cangrejero ejemplar (de *Macaca mulatta*) se muestra en la SEQ ID NO: 90 (n.º de acceso de Uniprot F6W5G6).

Los términos “anticuerpo anti-4-1BB”, “anti-4-1BB”, “anticuerpo contra 4-1BB” y “un anticuerpo que se une específicamente a 4-1BB” se refieren a un anticuerpo que es que se puede unir a 4-1BB con una suficiente afinidad, de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a 4-1BB. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-4-1BB a una proteína distinta de 4-1BB no relacionada es

5 menor de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a 4-1BB según se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA) o una citometría de flujo (FACS). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une a 4-1BB tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$, $\leq 0,1 \text{nM}$, $\leq 0,01 \text{nM}$ o $\leq 0,001 \text{nM}$ (por ejemplo, 10^{-6} M o menos, por ejemplo, de 10^{-6} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-10} M).

10 El término “conector peptídico” se refiere a un péptido que comprende uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente de 2 a 20 aminoácidos. Los conectores peptídicos se conocen en la técnica o se describen en el presente documento. Los conectores peptídicos no inmunógenos adecuados son, por ejemplo, los conectores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ o $G_4(SG_4)_n$ en los que “n” es en general un número entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4, en particular 2; es decir los péptidos seleccionados del grupo que consiste en GGGGS (SEQ ID NO: 91), GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 92), SGGGGGGGG (SEQ ID NO: 93) y GGGGSGGGGGGG (SEQ ID NO: 94), pero también incluye las secuencias GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 95), $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 96), $(G_4S)_4$ (SEQ ID NO: 97), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 98), GSGSGNGS (SEQ ID NO: 99), GGSGSGSG (SEQ ID NO: 100), GGSGSG (SEQ ID NO: 101), GGSG (SEQ ID NO: 102), GGSGNGSG (SEQ ID NO: 103), GGNGSGSG (SEQ ID NO: 104) y 20 GGNGSG (SEQ ID NO: 105). Los conectores peptídicos de particular interés son (G_4S) (SEQ ID NO: 91), $(G_4S)_2$ y GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 92).

25 El término “aminoácido”, como se usa en esta solicitud, indica el grupo de carboxi- α -aminoácidos naturales que comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

30 Por “fusionados” o “conectados” se quiere decir que los componentes (por ejemplo, un polipéptido y un ectodominio de 4-1BBL) están unidos por enlaces peptídicos, ya sea directamente o por medio de uno o más conectores peptídicos.

35 El “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia de polipéptidos (proteínas) de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas maneras que están dentro de la habilidad de la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN, SAWI o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, 40 incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían. En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que, de forma alternativa, se puede parafrasear como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia 45 de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

50 $100 \times \frac{X}{Y}$

55 donde X es el número de residuos de aminoácido puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácido de B. Se apreciará que, si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa

informático ALIGN-2.

En determinados modos de realización, se contemplan **variantes de secuencias de aminoácidos** de las moléculas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de las moléculas de unión a antígeno. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de las moléculas de unión a antígeno introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica las moléculas o por síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitutiva incluyen las HVR y las regiones estructurales (FR). Se proporcionan sustituciones conservadoras en la tabla C bajo el encabezamiento "Sustituciones preferentes" y se describen adicionalmente a continuación en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos (1) a (6). Se pueden introducir sustituciones aminoacídicas en la molécula de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, conservación/mejora de unión a antígeno, disminución en inmunogenicidad, o mejora en ADCC o CDC.

Tabla C

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras conllevarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

El término “**variantes de secuencia de aminoácidos**” incluye variantes sustanciales en las que hay sustituciones aminoacídicas en uno o más residuos de la región hipervariable de una molécula de unión a antígeno original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su estudio adicional tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenicidad reducida) con respecto a la molécula de unión a antígeno original y/o habrá(n) retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas de la molécula de unión a antígeno original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo de afinidad madurada que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, uno o más residuos de CDR mutan y las moléculas de unión a antígeno variantes se muestran en el fago y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión). En determinados modos de realización se pueden producir sustituciones, inserciones o delecciones dentro de una o más CDR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad de la molécula de unión a antígeno de unirse al antígeno. Por ejemplo, en las CDR se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporcionan en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se pueden seleccionar como diana para la mutagénesis se llama “mutagénesis por barrido de alanina” como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este procedimiento se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo molécula de unión a antígeno-antígeno para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar o eliminar como candidatos para sustitución. Se pueden cribar variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen moléculas de unión a antígeno con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula incluyen la fusión al extremo N o C con un polipéptido que incrementa la semivida en suero de las moléculas de unión a antígeno.

En determinados modos de realización, las moléculas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento se alteran para incrementar o disminuir el grado de glucosilación del anticuerpo. Las variantes de glucosilación de las moléculas se pueden obtener convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se creen o eliminan uno o más sitios de glucosilación. Cuando la molécula de unión a antígeno comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenario ramificado que se une en general por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el “tallo” de la estructura de oligosacárido biantenario. En algunos modos de realización, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en las moléculas de unión a antígeno para crear variantes con determinadas propiedades mejoradas. En un aspecto, se proporcionan variantes de moléculas de unión a antígeno que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada, véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. n.º 2003/0157108 (Presta, L.) o el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Otras variantes de las moléculas de unión a antígeno de la invención incluyen aquellas con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenario unido a la región Fc está bisectado por GlcNAc. Dichas variantes pueden tener una fucosilación reducida o una función ADCC mejorada, véase, por ejemplo, el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); la patente de EE. UU. n.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener función de CDC mejorada y se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel *et al.*); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

La “genomanipulación”, en particular con el prefijo “gluco”, así como el término “genomanipulación de la glucosilación” incluye la genomanipulación metabólica de la maquinaria de glucosilación de una célula, incluyendo las manipulaciones genéticas de las vías de síntesis de los oligosacáridos para lograr una alteración de la glucosilación de las glucoproteínas expresadas en las células. Además, la genomanipulación de la glucosilación incluye los efectos de las mutaciones y del medio celular sobre la glucosilación. En un modo de realización, la genomanipulación de la glucosilación es una alteración en la actividad de glucosaminiltransferasa. En un modo de realización particular, la genomanipulación da como resultado una actividad glucosaminiltransferasa y/o actividad fucosiltransferasa alteradas. La genomanipulación de la glucosilación se puede usar para obtener una “célula

5 huésped que tenga una actividad GnTIII incrementada" (por ejemplo, una célula huésped que se ha manipulado para expresar niveles incrementados de uno o más polipéptidos que tienen actividad β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), una "célula huésped que tiene actividad ManII incrementada" (por ejemplo, una célula huésped que se ha manipulado para expresar niveles incrementados de uno o más polipéptidos que tienen actividad α -manosidasa II (ManII)) o una "célula huésped que tiene actividad α -(1,6)-fucosiltransferasa disminuida" (por ejemplo, una célula huésped que se ha manipulado para expresar niveles disminuidos de α -(1,6)-fucosiltransferasa).

10 Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido que tiene actividad GnTIII" se refiere a polipéptidos que pueden catalizar la adición de un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en un enlace β -1,4 al manósido unido a β del núcleo de trimanosilo de oligosacáridos unidos a N. Esto incluye polipéptidos de fusión que presentan actividad enzimática similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de la β -(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como β -1,4-manosil-glucoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminiltransferasa (EC 2.4.1.144), de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), medida en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso de que exista dependencia de la dosis, no necesita ser idéntica a la de GnTIII, sino en su lugar, sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada en comparación con la GnTIII (es decir, el polipéptido candidato presentará mayor actividad o no más de aproximadamente 25 veces menos y, preferentemente, no más de aproximadamente diez veces menos actividad, y lo más preferentemente, no más de aproximadamente tres veces menos actividad en relación con la GnTIII).

15 La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo inmunitario que da lugar a la lisis de células diana recubiertas de anticuerpo por células efectoras inmunitarias. Las células diana son células a las que se unen específicamente anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden una región Fc, en general por medio de la parte de proteína que está en el extremo N de la región Fc. Como se usa en el presente documento, el término "**ADCC incrementada/reducida**" se define como un incremento/reducción del número de células diana que se lisan en un tiempo dado, a una concentración dada de anticuerpo en el medio que rodea las células diana, por el mecanismo de ADCC definido anteriormente, y/o bien una reducción/incremento de la concentración de anticuerpo, en el medio que rodea las células diana, requerida para lograr la lisis de un número dado de células diana en un tiempo dado, por el mecanismo de ADCC. El incremento/reducción de la ADCC es, en relación con la ADCC, mediada por el mismo anticuerpo, producido por el mismo tipo de células huésped, usando los mismos procedimientos estándar de producción, purificación, formulación y almacenamiento (que son conocidos por los expertos en la técnica), pero que no se ha genomanipulado. Por ejemplo, el incremento en ADCC mediada por un anticuerpo producido por células huésped genomanipuladas para que tengan un patrón alterado de glucosilación (por ejemplo, para expresar la glucosiltransferasa, GnTIII, u otras glucosiltransferasas) mediante los procedimientos descritos en el presente documento, es, en relación con la ADCC mediada por el mismo anticuerpo, producido por el mismo tipo de células huésped no genomanipuladas.

20 En determinados aspectos, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que la convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aunque determinadas funciones efectoras (tal como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por tanto, probablemente carece de actividad de ADCC), pero mantiene su capacidad de unión a FcRn. Las células principales para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radioactivo (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar *in vivo* la actividad de ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y por tanto carece de actividad de CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). La unión a FcRn y la determinación de la eliminación/semivida *in vivo* también se pueden realizar usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12): 1759-1769, (2006); documento WO 2013/120929 A1).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, 5 incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581). Se describen determinadas variantes de anticuerpo con una mejora o reducción en la unión a FcR. (Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.737.056; documento WO 2004/056312 y Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)). En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que mejoran la ADCC, por ejemplo, 10 sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En determinados aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que disminuyen la unión a FcγR, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 234 y 235 de la región Fc (numeración EU de residuos). En un aspecto, las sustituciones son L234A y L235A (LALA). En determinados 15 aspectos, la variante de anticuerpo comprende además D265A y/o P329G en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. En un aspecto, las sustituciones son L234A, L235A y P329G (LALA-PG) en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. (Véase, por ejemplo, el documento WO 2012/130831). En otro aspecto, las sustituciones son L234A, L235A y D265A (LALA-DA) en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana.

20 En algunos modos de realización, se realizan las alteraciones en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o reducidas), por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 e Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

25 Los anticuerpos con un incremento en las semividas y una mejora en la unión al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24:249 (1994)) se describen en el documento US2005/0014934 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn.

30 Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 252, 254, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 7.371.826; Dall'Acqua, W.F. *et al.*, J. Biol. Chem. 281 (2006) 23514-23524).

35 En determinados aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a FcRn, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 253 y/o 310 y/o 435 de la región Fc (numeración EU de residuos). En determinados aspectos, la variante de anticuerpo comprende una región Fc con las sustituciones aminoacídicas en las posiciones 253, 310 y 435. En un aspecto, las sustituciones son I253A, H310A y H435A en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. Véase, por ejemplo, 40 Grevys, A. *et al.*, J. Immunol. 194 (2015) 5497-5508.

En otro aspecto, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a FcRn, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 310 y/o 433 y/o 436 de la región Fc (numeración UE de residuos). En determinados aspectos, la variante de anticuerpo comprende una región Fc con las sustituciones aminoacídicas en las posiciones 310, 433 y 436. En un aspecto, las sustituciones son H310A, 45 H433A y Y436A en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. (Véase, por ejemplo, el documento WO 2014/177460 A1).

50 En determinados aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que incrementan la unión a FcRn, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 252 y/o 254 y/o 256 de la región Fc (numeración UE de residuos). En determinados modos de realización, la variante de anticuerpo comprende una región Fc con sustituciones aminoacídicas en las posiciones 252, 254 y 256. En un modo de realización, las sustituciones son M252Y, S254T y T256E en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana (véase también Duncan y Winter, Nature 322:738-40 (1988); la patente de EE. UU. n.º 5.648.260; la 55 patente de EE. UU. n.º 5.624.821 y el documento WO 94/29351 en relación con otros ejemplos de variantes de región Fc).

En determinados modos de realización puede ser deseable crear **variantes genomanipuladas con cisteína** de las moléculas de unión a antígeno de la invención, por ejemplo, "tioMAb", en los que uno o más residuos de la molécula se sustituyen por residuos de cisteína. En modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles de la molécula. Al sustituir esos residuos por cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan, de este modo, en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjungado. En determinados modos de realización se puede sustituir uno cualquiera o más de los siguientes residuos por cisteína: 60 V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Se pueden generar moléculas de unión a antígeno genomanipuladas 65

con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

En determinados aspectos, las moléculas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento se pueden modificar además para que contengan restos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polí(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)/polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxetilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar en base a consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se van a mejorar, si el derivado de anticuerpo biespecífico se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc. En otro aspecto, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteínico que se pueden calentar selectivamente por exposición a la radiación. En un modo de realización, el resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam, N.W. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, longitudes de onda que no dañan células normales, pero que calientan el resto no proteínico hasta una temperatura a la que las células próximas al anticuerpo-resto no proteínico se destruyen. En otro aspecto, se pueden obtener inmuconoconjungados de las moléculas de unión a antígeno que contienen 4-1BBL proporcionadas en el presente documento. Un “**inmuconoconjungado**” es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterogéneas, incluyendo pero sin limitarse a un agente citotóxico.

El término “**polinucleótido**” se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN derivado de virus o ADN de plásmido (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en los ácidos peptidonucleicos (APN)). El término “molécula de ácido nucleico” se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

Por molécula de ácido nucleico o polinucleótido “**aislado**” se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN que se ha retirado de su entorno natural. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido contenido en un vector se considera aislado para los propósitos de la presente invención. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterógenas o polinucleótidos (parcial o sustancialmente) purificados en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula polinucleotídica contenida en células que normalmente contienen la molécula polinucleotídica, pero la molécula polinucleotídica está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente invención, así como formas de hebras positivas y negativas y formas bicatenarias. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente invención incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, sitio de unión a ribosoma o un finalizador de la transcripción.

Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, un 95 % “**idéntica**” a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia polinucleotídica puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5 % de los nucleótidos de la secuencia de referencia se pueden deletrear o sustituir por otro nucleótido, o un número de nucleótidos de hasta un 5 % de los nucleótidos totales de la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los residuos de la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Como cuestión práctica, si cualquier secuencia polinucleotídica particular es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de la presente invención, se puede determinar convencionalmente usando programas informáticos conocidos, tales como los analizados anteriormente para polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

El término “**casete de expresión**” se refiere a un polinucleótido generado de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico determinado en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plástido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la porción de

casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y un promotor. En determinados modos de realización, el casete de expresión de la invención comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

- 5 El término “**vector**” o “vector de expresión” es sinónimo de “construcción de expresión” y se refiere a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que se asocia de forma funcional en una célula diana. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. El vector de expresión de la presente invención comprende un casete de expresión. Los vectores de expresión permiten la transcripción de grandes cantidades de ARNm estable. Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula diana, la molécula de ácido ribonucleico o proteína que está codificada por el gen se produce por el mecanismo de transcripción y/o traducción celular. En un modo de realización, el vector de expresión de la invención comprende un casete de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

10 Los términos “**célula huésped**”, “línea celular huésped” y “cultivo de células huésped” se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen “transformantes” y “células transformadas”, que incluyen la célula transformada principal y la descendencia derivada de la misma, independientemente del número de pasos. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento. Una célula huésped es cualquier tipo de sistema celular que se puede usar para generar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente invención. Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamíferos, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insectos y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido vegetal o animal cultivado.

15 20 25 30 Una “**cantidad eficaz**” de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para dar como resultado un cambio fisiológico en la célula o tejido al que se administra.

35 Una “**cantidad terapéuticamente eficaz**” de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye, retrasa, minimiza o previene efectos adversos de una enfermedad.

40 Un “**individuo**” o “**sujeto**” es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En particular, el individuo o sujeto es un humano.

45 50 El término “**composición farmacéutica**” se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

55 Un “**vehículo farmacéuticamente aceptable**” se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un excipiente farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, un estabilizador o un conservante.

60 65 El término “**prospecto del envase**” se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

Como se usa en el presente documento, “**tratamiento**” (y variaciones gramaticales del mismo tales como “tratar” o “que trata”) se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se está tratando, y se puede realizar para profilaxis o bien durante la evolución de la enfermedad clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunos modos de realización, las moléculas de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

65 70 75 El término “**cáncer**”, como se usa en el presente documento, se refiere a enfermedades proliferativas, tales como

linfomas o leucemias linfocíticas o melanoma.

Por "trastorno proliferativo de linfocitos B" se quiere decir una enfermedad en la que el número de linfocitos B en un paciente se incrementa en comparación con el número de linfocitos B en un sujeto sano, y en particular en la que el incremento en el número de linfocitos B es la causa o rasgo característico de la enfermedad. Un "trastorno proliferativo de linfocitos B positivos para CD20" es un trastorno proliferativo de linfocitos B en el que los linfocitos B, en particular los linfocitos B malignos (además de los linfocitos B normales), expresan CD20. Los trastornos ejemplares de proliferación de linfocitos B incluyen linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de zona marginal (LZM), así como algunos tipos de mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH).

Anticuerpos biespecíficos anti-CD20/anti-CD3 ejemplares para su uso en la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos anti-CD20/anti-CD3 y a su uso en combinación con agonistas de 4-1BB (CD137), en particular a su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, más en particular para tratar o retrasar la progresión de los trastornos proliferativos de linfocitos B. Los anticuerpos biespecíficos anti-CD20/anti-CD3, como se usan en el presente documento, son anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20.

Por tanto, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3, como se usa en el presente documento, comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD3) y una región variable de la cadena ligera (V_L CD3) y un segundo dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD20) y una región variable de la cadena ligera (V_L CD20).

En un aspecto particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en la combinación comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD3) que comprende la secuencia CDR-H1 de SEQ ID NO: 56, la secuencia CDR-H2 de SEQ ID NO: 57 y la secuencia CDR-H3 de SEQ ID NO: 58; y/o una región variable de la cadena ligera (V_L CD3) que comprende la secuencia CDR-L1 de SEQ ID NO: 59, la secuencia CDR-L2 de SEQ ID NO: 60 y la secuencia CDR-L3 de SEQ ID NO: 61. Más en particular, el anti-CD20/anti-CD3 biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD3) que es al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y/o una región variable de la cadena ligera (V_L CD3) que es al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y/o una región variable de la cadena ligera (V_L CD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63.

En un aspecto, el anticuerpo que se une específicamente a CD3 es un anticuerpo de longitud completa. En un aspecto, el anticuerpo que se une específicamente a CD3 es un anticuerpo de la clase IgG humana, en particular un anticuerpo de la clase IgG1 humana. En un aspecto, el anticuerpo que se une específicamente a CD3 es un fragmento de anticuerpo, en particular una molécula Fab o una molécula scFv, más en particular una molécula Fab. En un aspecto particular, el anticuerpo que se une específicamente a CD3 es una molécula Fab de entrecruzamiento en la que los dominios variables o los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de Fab se intercambian (es decir, se reemplazan entre sí). En un aspecto, el anticuerpo que se une específicamente a CD3 es un anticuerpo humanizado.

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un segundo dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD20) que comprende la secuencia CDR-H1 de SEQ ID NO: 64, la secuencia CDR-H2 de SEQ ID NO: 65 y la secuencia CDR-H3 de SEQ ID NO: 66, y/o una región variable de la cadena ligera (V_L CD20) que comprende la secuencia CDR-L1 de SEQ ID NO: 67, la secuencia CDR-L2 de SEQ ID NO: 68, y la secuencia CDR-L3 de SEQ ID NO: 69. Más en particular, el anti-CD20/anti-CD3 biespecífico comprende un segundo dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD20) que es al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y/o una región variable de la cadena ligera (V_L CD20) que es al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71. En otro aspecto, el anti-CD20/anti-CD3 biespecífico comprende un segundo dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD20) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y/o una región variable de la cadena ligera (V_L CD20) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

En otro aspecto particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un tercer dominio de unión a antígeno que se une a CD20. En particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un tercer dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD20) que comprende la secuencia CDR-H1 de SEQ ID NO: 64, la secuencia CDR-H2 de SEQ ID NO: 65 y la secuencia CDR-H3 de

SEQ ID NO: 66; y/o una región variable de la cadena ligera (V_L CD20) que comprende la secuencia CDR-L1 de SEQ ID NO: 67, la secuencia CDR-L2 de SEQ ID NO: 68 y la secuencia CDR-L3 de SEQ ID NO: 69. Más en particular, el anti-CD20/anti-CD3 biespecífico comprende un tercer dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD20) que es al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y/o una región variable de la cadena ligera (V_L CD20) que es al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71. En otro aspecto, el anti-CD20/anti-CD3 biespecífico comprende un tercer dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD20) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y/o una región variable de la cadena ligera (V_L CD20) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 es un anticuerpo biespecífico en el que el primer dominio de unión a antígeno es una molécula cross-Fab en la que los dominios variables o los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de Fab se intercambian, y el segundo y tercer dominio de unión a antígeno, si está presente, es una molécula Fab convencional.

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 es un anticuerpo biespecífico en el que (i) el segundo dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer dominio de unión a antígeno, el primer dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y el tercer dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc, o (ii) el primer dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo dominio de unión a antígeno, el segundo dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y el tercer dominio de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc.

Las moléculas Fab se pueden fusionar al dominio Fc o entre sí directamente o a través de un conector peptídico, que comprende uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2-20 aminoácidos. Los conectores peptídicos son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. Los conectores peptídicos no inmunógenos adecuados incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, "n" en general es un número entero de 1 a 10, típicamente de 2 a 4. En un modo de realización, dicho conector peptídico tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos, en un modo de realización una longitud de 5 a 100, en otro modo de realización de 10 a 50 aminoácidos. En un modo de realización, dicho conector peptídico es $(G_xS)_n$ o $(G_xS)_nG_m$ con G = glicina, S = serina, y $(x = 3, n = 3, 4, 5 \text{ o } 6, y m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$ o $(x = 4, n = 2, 3, 4 \text{ o } 5 \text{ y } m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$, en un modo de realización $x = 4$ y $n = 2 \text{ o } 3$, en otro modo de realización $x = 4$ y $n = 2$. En un modo de realización, dicho conector peptídico es $(G_4S)_2$. Un conector peptídico en particular adecuado para fusionar las cadenas ligeras de Fab de la primera y la segunda molécula Fab entre sí es $(G_4S)_2$. Un conector peptídico ejemplar adecuado para conectar las cadenas pesadas de Fab del primer y segundo fragmento de Fab comprende la secuencia $(D)-(G_4S)_2$. Otro conector adecuado de este tipo comprende la secuencia $(G_4S)_4$. Adicionalmente, los conectores pueden comprender (una porción de) una región bisagra de inmunoglobulina. En particular, cuando una molécula Fab se fusiona al extremo N de una subunidad del dominio Fc, se puede fusionar por medio de una región bisagra de inmunoglobulina o una porción de la misma, con o sin un conector peptídico adicional.

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un dominio Fc que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora. En particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G.

En un aspecto particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 76, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 77, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 78, y un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 79. En otro modo de realización particular, el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 76, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 77, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 78 y una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 79 (TCB CD20).

Los anticuerpos biespecíficos particulares se describen en la publicación PCT n.º WO 2016/020309 A1 o en el documento WO 2015/095392 A1.

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 también puede comprender un acoplador de linfocitos T biespecífico (BiTE®). En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 es XmAb®13676. En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico es REGN1979. En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico es FBTA05 (*Lymphomun*).

Agonistas de 4-1BB ejemplares para su uso en la invención

En particular, los agonistas de 4-1BB que comprenden al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 como se usa en combinación con el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 son moléculas que comprenden 4-1BBL. En particular, el agonista de 4-1BB usado en la invención comprende tres ectodomios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos.

En un aspecto particular, el agonista de 4-1BB es una molécula que comprende tres ectodomios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y en el que los ectodomios de 4-1BBL comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, en particular la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5.

En el presente documento se ha demostrado que el agonista de 4-1BB es especialmente útil si comprende un dominio de unión a antígeno que es específico para una diana tumoral, en particular para una diana en linfocitos B. Por tanto, en otro aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodomios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19.

Se ha demostrado además en el presente documento que un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 no fue internalizado por CD19 en linfocitos B y, por tanto, no perdió su capacidad de interacción con el microambiente tumoral. En un aspecto adicional, se proporciona un agonista de 4-1BB que no se internalizará en linfocitos B, manteniendo de este modo su actividad.

En otro aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodomios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y al menos un resto que se puede unir específicamente a CD19, en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 tiene reactividad cruzada con macaco cangrejero, es decir, el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 se une específicamente a CD19 humano y de macaco cangrejero.

En otro aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodomios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y al menos un resto que se puede unir específicamente a CD19, en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende: (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, o

(b) un dominio VH que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; y un dominio VL que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

En un aspecto particular, el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende un dominio VH que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; y un dominio VL que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

En otro aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodomios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19, en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, o en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

Más en particular, el dominio de unión a antígeno que se puede unir a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

En otro aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende además un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable. En un aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc de IgG, específicamente un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. En particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora. En un aspecto particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G.

- 10 En un aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende
(a) al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19,
15 (b) un primer y segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en el que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo.

En un aspecto particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende
20 (a) al menos un dominio Fab que se puede unir específicamente a CD19, y
(b) un primer y segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que
25 (i) el primer polipéptido contiene un dominio CH1 o CL y el segundo polipéptido contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en el que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido por un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en el que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un conector peptídico, y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o
30 (ii) el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en el que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí y al extremo C del dominio CH3 por un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico al extremo C del dominio CH3 de dicho polipéptido, o
35 (iii) el primer polipéptido contiene un dominio VH-CL o un dominio VL-CH1 y el segundo polipéptido contiene un dominio VL-CH1 o un dominio VH-CL, respectivamente, en el que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido por un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en el que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí y al VH o VL mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico a VL o VH de dicho polipéptido.
40

En otro aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende
45 (a) al menos un dominio Fab que se puede unir específicamente a CD19 que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera (V_LCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera (V_LCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, y
50 (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32; y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
55

En un aspecto particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno seleccionada del grupo que consiste en
60 (a) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 33, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;

- 5 b) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;
 - 10 c) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40;
 - 15 d) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;
 - 20 e) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44;
 - 25 f) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;
 - 30 g) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;
 - 35 h) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;
 - 40 i) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50;
 - 45 j) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;
 - 50 k) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y
 - 55 l) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52.
- En otro aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende
- (a) al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19,
 - 60 (b) un polipéptido que comprende tres ectodomelios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí mediante conectores peptídicos.
- En un aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende
- 65 (a) al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19,

- (b) un polipéptido que comprende tres ectodomios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí mediante conectores peptídicos, y
- 5 (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable, en el que el polipéptido que comprende los tres ectodomios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí mediante conectores peptídicos se fusiona con el aminoácido N o C terminal de una de las dos subunidades del dominio Fc, opcionalmente a través de un conector peptídico.
- 10 En un aspecto particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno seleccionada del grupo que consiste en
- 15 (a) una molécula que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53,
- 20 (b) una molécula que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53;
- 25 (c) una molécula que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, y
- 30 (d) una molécula que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55.
- En otro aspecto, el agonista de 4-1BB es un anticuerpo biespecífico anti-CD19/anti-4-1BB.
- Preparación de anticuerpos biespecíficos para su uso en la invención**
- 35 En determinados aspectos, los agentes terapéuticos usados en la combinación comprenden anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados aspectos, las especificidades de unión son para diferentes antígenos. En determinados aspectos, las especificidades de unión son para diferentes epitopos del mismo antígeno. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.
- 40 Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen especificidades diferentes (véanse Milstein y Cuello, Nature 305: 537 (1983)), documento WO 93/08829, y Traunecker *et al.*, EMBO J. 10: 3655 (1991), y genomanipulación por "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodímeras en Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980 y Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros en Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al.*, J. Immunol. 147: 60 (1991).
- 45 En el presente documento también se incluyen anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).
- 50 60 Los anticuerpos o fragmentos en el presente documento también incluyen un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a dos antígenos diferentes (véase el documento US 2008/0069820, por ejemplo). Los anticuerpos "Crossmab" también se incluyen en el presente documento (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO2009/080253 o WO2009/080254).
- 55 65 Otra técnica para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico es el "acoplador de linfocitos T biespecífico" o enfoque BiTE® (véanse, por ejemplo, los documentos WO2004/106381, WO2005/061547, WO2007/042261 y

WO2008/119567). Este enfoque utiliza dos dominios variables de anticuerpo dispuestos en un único polipéptido. Por ejemplo, una cadena polipeptídica única incluye dos fragmentos Fv monocatenarios (scFv), teniendo cada uno un dominio de la cadena pesada variable (VH) y uno de la cadena ligera variable (VL) separados por un conector polipeptídico de una longitud suficiente para permitir la asociación intramolecular entre los dos dominios. Este polipéptido único incluye además una secuencia espaciadora polipeptídica entre los dos fragmentos scFv. Cada scFv reconoce un epítopo diferente, y estos epítulos pueden ser específicos para diferentes tipos celulares, de modo que las células de dos tipos celulares diferentes se acercan en estrecha proximidad o se anclan cuando cada scFv se acopla con su epítopo afín. Un modo de realización particular de este enfoque incluye un scFv que reconoce un antígeno de la superficie celular expresado por una célula inmunitaria, por ejemplo, un polipéptido CD3 en un linfocito T, unido a otro scFv que reconoce un antígeno de la superficie celular expresado por una célula diana, tal como una célula cancerosa o tumoral.

Como es un polipéptido único, el acoplador de linfocitos T biespecífico se puede expresar usando cualquier sistema de expresión de células procariotas o eucariotas conocido en la técnica, por ejemplo, una línea celular CHO. Sin embargo, pueden ser necesarias técnicas de purificación específicas (véase, por ejemplo, el documento EP1691833) para separar acopladores de linfocitos T biespecíficos monoméricos de otras especies multiméricas, que pueden tener actividades biológicas distintas de la actividad prevista del monómero. En un esquema de purificación ejemplar, una solución que contiene polipéptidos secretados se somete en primer lugar a una cromatografía de afinidad por metales, y los polipéptidos se eluyen con un gradiente de concentraciones de imidazol. Este eluido se purifica además usando cromatografía de intercambio aniónico, y los polipéptidos se eluyen usando un gradiente de concentraciones de cloruro de sodio. Finalmente, este eluido se somete a cromatografía de exclusión por tamaño para separar monómeros de especies multiméricas. En un aspecto, los anticuerpos biespecíficos usados en la invención están compuestos por una única cadena polipeptídica que comprende dos fragmentos Fv monocatenarios (scFv) fusionados entre sí mediante un conector peptídico.

Modificaciones en el dominio Fc que reducen la unión al receptor de Fc y/o la función efectora

El dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno de la invención consiste en un par de cadenas polipeptídicas que comprenden dominios de la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es un dímero, del que cada unidad comprende los dominios constantes de la cadena pesada de IgG CH2 y CH3. Las dos subunidades del dominio Fc se pueden asociar de manera estable entre sí.

El dominio Fc confiere propiedades farmacocinéticas favorables a las moléculas de unión a antígeno de la invención, que incluyen una larga semivida en suero que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una proporción de distribución tejido-sangre favorable. Al mismo tiempo, sin embargo, puede dar lugar a una dirección indeseable de los anticuerpos biespecíficos de la invención hacia células que expresan receptores de Fc en lugar de hacia células portadoras de antígeno preferentes. En consecuencia, en aspectos particulares, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno de la invención presenta una afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG1 natural. En un aspecto, el Fc no se une sustancialmente a un receptor de Fc ni induce la función efectora. En un aspecto particular, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ. En un aspecto, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En un aspecto específico, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ humano activador, más específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, lo más específicamente FcγRIIIa humano. En un aspecto, el dominio Fc no induce la función efectora. La función efectora reducida puede incluir, pero no se limita a, una o más de las siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, captación de antígenos mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígenos reducida, unión a linfocitos NK reducida, unión a macrófagos reducida, unión a monocitos reducida, unión a células polimorfonucleares reducida, señalización directa inductora de la apoptosis reducida, maduración de células dendríticas reducida o activación de linfocitos T reducida.

En determinados aspectos, se pueden introducir una o más modificaciones aminoacídicas en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprenda una modificación aminoacídica (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En un aspecto particular, la invención proporciona un anticuerpo, en el que el dominio Fc comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor de Fc, en particular al receptor de Fcγ.

En un aspecto, el dominio Fc del anticuerpo de la invención comprende una o más mutaciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc y/o la función efectora. Típicamente, la misma o más mutaciones aminoacídicas están presentes en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En particular, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en una posición de E233, L234, L235, N297, P331 y P329 (numeración EU). En particular, el dominio Fc comprende sustituciones aminoacídicas en las

- posiciones 234 y 235 (numeración EU) y/o 329 (numeración EU) de las cadenas pesadas de IgG. Más en particular, se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende un dominio Fc con las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G ("P329G LALA", numeración EU) en las cadenas pesadas de IgG. Las sustituciones aminoacídicas L234A y L235A se refieren a la denominada mutación LALA. La combinación "P329G LALA" de sustituciones aminoacídicas anula casi por completo la unión al receptor de Fcy de un dominio Fc de IgG1 humana y se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2012/130831 A1 que también describe procedimientos para preparar dichos dominios Fc mutantes y procedimientos para determinar sus propiedades tales como la unión al receptor de Fc o funciones efectoras.
- 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- Los dominios Fc con unión al receptor de Fc reducida y/o función efectora reducida incluyen también aquellas con sustitución de uno o más de los residuos de dominio Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de la región Fc (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).
- En otro aspecto, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4. Los anticuerpos de IgG4 presentan una afinidad de unión reducida por receptores de Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con anticuerpos de IgG1. En un aspecto más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 que comprende una sustitución aminoacídica en la posición S228 (numeración de Kabat), en particular la sustitución aminoacídica S228P. En un aspecto más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 que comprende las sustituciones aminoacídicas L235E y S228P y P329G (numeración EU). Dichos mutantes del dominio Fc de IgG4 y sus propiedades de unión al receptor de Fcy se describen también en el documento WO 2012/130831.
- Se pueden preparar dominios Fc mutantes por delección, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis específica de sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios nucleotídicos correctos se pueden verificar, por ejemplo, por secuenciación.
- La unión a receptores de Fc se puede determinar fácilmente, por ejemplo, por ELISA, o por resonancia de plasmón superficial (RPS) usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIACore (GE Healthcare), y receptores de Fc tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. De forma alternativa, se puede evaluar la afinidad de unión de dominios Fc o anticuerpos activadores de células que comprenden un dominio Fc para receptores de Fc usando líneas celulares conocidas por expresar receptores de Fc particulares, tales como linfocitos NK humanos que expresan el receptor de Fc γ IIa.
- La función efectora de un dominio Fc, o de los anticuerpos de la invención que comprenden un dominio Fc, se puede medir mediante procedimientos conocidos en la técnica. Un ensayo adecuado para medir la ADCC se describe en el presente documento. Otros ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362; Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patente de EE. UU. n.º 5.821.337; Bruggemann *et al.*, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo Cytotoxic 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).
- En algunos aspectos, se reduce la unión del dominio Fc a un componente de complemento, específicamente a C1q. En consecuencia, en algunos modos de realización en los que se genomanipula el dominio Fc para que tenga una función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye CDC reducida. Se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si la molécula biespecífica de unión a antígeno de la invención se puede unir a C1q y, por lo tanto, tiene actividad de CDC (véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402). Para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg *et al.*, Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Modificaciones en el dominio Fc que promueven la heterodimerización

- Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención comprenden sitios de unión a antígeno diferentes, fusionados a una o la otra de las dos subunidades del dominio Fc; por tanto, las dos subunidades del dominio Fc pueden estar comprendidas en dos cadenas polipeptídicas no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización dan lugar a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de los anticuerpos biespecíficos de la invención en la producción recombinante, será ventajoso, por tanto, introducir en el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

En consecuencia, en aspectos particulares, la invención se refiere a la molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende (a) al menos un resto que se puede unir específicamente a CD19, (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de FNT o dos fragmentos de los mismos que están conectados entre sí por un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de FNT o un fragmento del mismo, y (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable, en el que el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más extensa entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana está en el dominio CH3 del dominio Fc. Por tanto, en un aspecto, dicha modificación está en el dominio CH3 del dominio Fc.

En un aspecto específico, dicha modificación es una modificación llamada "botón en ojal", que comprende una modificación de "botón" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de "ojal" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc. Por tanto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que comprende (a) al menos un resto que se puede unir específicamente a CD19, (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de FNT o dos fragmentos de los mismos que están conectados entre sí por un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de FNT o un fragmento del mismo, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable, en el que la primera subunidad del dominio Fc comprende botones y la segunda subunidad del dominio Fc comprende ojales de acuerdo con el procedimiento de botones en ojales. En un aspecto particular, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas S354C y T366W (numeración EU) y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas Y349C, T366S e Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway *et al.*, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfase de un primer polipéptido y una correspondiente cavidad ("ojal") en la interfase de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se puede situar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

En consecuencia, en un aspecto, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando de este modo una protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad que se puede colocar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad en la que se puede colocar la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad. La protuberancia y la cavidad se pueden realizar alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, por mutagénesis específica de sitio o por síntesis de péptidos. En un aspecto específico, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza el residuo de treonina en la posición 366 por un residuo de triptófano (T366W), y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza el residuo de tirosina en la posición 407 por un residuo de valina (Y407V). En un aspecto, en la segunda subunidad del dominio Fc adicionalmente se reemplaza el residuo de treonina en la posición 366 por un residuo de serina (T366S) y se reemplaza el residuo de leucina en la posición 368 por un residuo de alanina (L368A).

Aún en otro aspecto, en la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza adicionalmente el residuo de serina en la posición 354 por un residuo de cisteína (S354C), y en la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza adicionalmente el residuo de tirosina en la posición 349 por un residuo de cisteína (Y349C). La introducción de estos dos residuos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc que estabiliza adicionalmente el dímero (Carter (2001), J Immunol Methods 248, 7-15). En un aspecto particular, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas S354C y T366W (numeración EU) y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas Y349C, T366S e Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto alternativo, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media en los efectos de conducción electrostática, por ejemplo, como se describe en la publicación PCT WO 2009/089004. En general, este procedimiento implica el reemplazo de uno

o más residuos de aminoácidos en la interfase de las dos subunidades del dominio Fc por residuos de aminoácidos cargados de modo que la formación de homodímeros se vuelve electrostáticamente desfavorable, pero la heterodimerización es electrostáticamente favorable.

- 5 El extremo C de la cadena pesada del anticuerpo biespecífico como se informa en el presente documento puede ser un extremo C completo que termina con los residuos de aminoácidos PGK. El extremo C de la cadena pesada puede ser un extremo C acortado en el que se han retirado uno o dos de los residuos de aminoácidos C terminales. En un aspecto preferente, el extremo C de la cadena pesada es un extremo C acortado que termina en PG. En un aspecto de todos los aspectos como se informa en el presente documento, un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 C terminal, como se especifica en el presente documento, comprende el dipéptido glicina-lisina C terminal (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 C terminal, como se especifica en el presente documento, comprende un residuo de glicina C terminal (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Modificaciones en los dominios Fab

- 20 En un aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene 4-1BBL, que comprende (a) un fragmento Fab que se puede unir específicamente a CD19, (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodomelios de 4-1BBL o dos fragmentos de los mismos que están conectados entre sí mediante un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable, en el que en uno de los fragmentos Fab se intercambian los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL. Los anticuerpos biespecíficos se preparan de acuerdo con la tecnología Crossmab.
- 25 Los anticuerpos multiespecíficos con un reemplazo/intercambio de dominios en un brazo de unión (CrossMabVH-VL o CrossMabCH-CL) se describen en detalle en el documento WO 2009/080252 y Schaefer, W. et al., PNAS, 108 (2011) 11187-11191. Reducen claramente los subproductos causados por el emparejamiento erróneo de una cadena ligera frente a un primer antígeno con la cadena pesada equivocada frente al segundo antígeno (en comparación con los enfoques sin dicho intercambio de dominios).
- 30 35 En un aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende (a) un primer fragmento Fab que se puede unir específicamente a CD19, (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodomelios de 4-1BBL o dos fragmentos de los mismos que están conectados entre sí mediante un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo, y en el que cada uno de ellos está unido a un dominio CH1 o CL, y (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable, en el que los dominios constantes CL y CH1 contiguos a 4-1BBL se sustituyen entre sí, de modo que el dominio CH1 es parte de la cadena ligera y el dominio CL es parte de la cadena pesada.
- 40 45 En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende (a) dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas de un anticuerpo que comprende dos fragmentos Fab que se pueden unir específicamente a un miembro de la familia del receptor de FNT coestimulador y al dominio Fc, y (b) dos fragmentos Fab adicionales que se pueden unir específicamente a un antígeno de la célula diana, en el que dichos fragmentos Fab adicionales están conectados cada uno por medio de un conector peptídico al extremo C de las cadenas pesadas de (a). En un aspecto particular, los fragmentos Fab adicionales son fragmentos Fa, en los que los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí de modo que el dominio VH es parte de la cadena ligera y el dominio VL es parte de la cadena pesada.
- 50 55 En otro aspecto, y para mejorar adicionalmente el emparejamiento correcto, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende (a) un primer fragmento Fab que se puede unir específicamente a CD19, (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodomelios de 4-1BBL o dos fragmentos de los mismos que están conectados entre sí mediante un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo, y en el que cada uno de ellos está unido a un dominio CH1 o CL, y (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable, puede contener diferentes sustituciones aminoacídicas cargadas (los llamados "residuos cargados"). Estas modificaciones se introducen en los dominios CH1 y CL cruzados o no cruzados. En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno biespecífica, en el que en uno de los dominios CL el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se ha sustituido por lisina (K) y en el que en uno de los dominios CH1 los aminoácidos en la posición 147 (numeración UE) se han sustituidos por
- 60 65

ácido glutámico (E).

Más en particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende un Fab, en la que en el dominio CL contiguo al miembro de la familia de ligandos de FNT, el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración UE) se ha sustituido por lisina (K), y en el que en el dominio CH1 contiguo al miembro de la familia de ligandos de FNT los aminoácidos en la posición 147 (numeración UE) y en la posición 213 (numeración UE) se han sustituido por ácido glutámico (E).

10 Polinucleótidos

La invención proporciona además polinucleótidos aislados que codifican un anticuerpo biespecífico como se describe en el presente documento o un fragmento del mismo.

15 Los polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos de la invención se pueden expresar como un polinucleótido único que codifica toda la molécula de unión a antígeno o como polinucleótidos múltiples (por ejemplo, dos o más) que se coexpresan. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se coexpresan se pueden asociar a través de, por ejemplo, enlaces disulfuro u otros medios para formar una molécula de unión a antígeno funcional. Por ejemplo, se puede codificar la parte de la cadena ligera de una inmunoglobulina por un
20 polinucleótido separado de la parte de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Cuando se coexpresan, los polipéptidos de la cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de la cadena ligera para formar la inmunoglobulina.

25 En algunos aspectos, el polinucleótido aislado codifica todo el anticuerpo de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento. En otros modos de realización, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido comprendido en el anticuerpo de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento.

30 En determinados modos de realización, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otros modos de realización, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN de la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario.

Procedimientos recombinantes

35 Se pueden obtener anticuerpos biespecíficos como se usan en la invención, por ejemplo, mediante síntesis de péptidos en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, se aislan e insertan uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmentos polipeptídicos del mismo, por ejemplo, como se describe anteriormente, en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho polinucleótido se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales. En un aspecto de la invención, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención. Se pueden usar procedimientos que sean bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan la secuencia codificante de un anticuerpo (fragmento) junto con señales de control de la transcripción/traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo/recombinación genética*. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); y Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que el polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmentos polipeptídicos del mismo (es decir, la región codificante) se clona en asociación funcional con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o de la traducción. Como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una parte de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, se puede considerar que es parte de una región codificante, si está presente; sin embargo, cualquier secuencia flanqueante, 55 por ejemplo promotores, sitios de unión a ribosoma, finalizadores de la transcripción, intrones, regiones no traducidas 5' y 3' y similares, no forma parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes pueden estar presentes en una única construcción de polinucleótidos, por ejemplo, en un único vector, o en construcciones de polinucleótidos separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector de la presente invención puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan de forma postraduccional o cotraduccional en las proteínas finales por medio de escisión proteolítica. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterógenas, fusionadas o bien no fusionadas a un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención o fragmentos polipeptídicos del mismo, o variantes o derivados del mismo. Las regiones codificantes heterógenas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterógeno. Una asociación funcional es cuando una región codificante de un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más

secuencias reguladoras de tal forma que sitúa la expresión del producto génico bajo la influencia o control de la(s) secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con la misma) se “asocian de forma funcional” si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión de dirigir la expresión del producto génico ni interfiere con la capacidad del molde de ADN de transcribirse. Por tanto, una región promotora se asociaría de forma funcional con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor puede efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, se pueden asociar de forma funcional con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula.

En el presente documento se divultan promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción. Los expertos en la técnica conocen una variedad de regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción, que funcionan en células de vertebrado, tales como, pero sin limitarse a, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano inmediato, conjuntamente con intrón-A), virus de simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tales como, por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovina y α -globina de conejo, así como otras secuencias que pueden controlar la expresión génica en células eucariotas. Regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles (por ejemplo, promotores inducibles por tetraciclinas). De forma similar, los expertos en la técnica conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, pero no se limitan a, sitios de unión a ribosoma, codones de iniciación y terminación de la traducción y elementos derivados de sistemas víricos (en particular un sitio de entrada a ribosoma interno o IRES, también denominado secuencia CITE). El casete de expresión también puede incluir otros rasgos característicos tales como un origen de replicación y/o elementos de integración cromosómica tales como repeticiones terminales largas (LTR) retrovíricas o repeticiones terminales invertidas (ITR) víricas adenoasociadas (AAV).

Se pueden asociar regiones codificantes de polinucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, si se desea la secreción del anticuerpo o de fragmentos polipeptídicos del mismo, el ADN que codifica una secuencia señal se puede colocar en dirección 5' del ácido nucleico y de un anticuerpo de la invención o fragmentos polipeptídicos del mismo. De acuerdo con la hipótesis de señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína en crecimiento a través del retículo endoplásmico rugoso. Los expertos en la técnica saben que los polipéptidos segregados por células de vertebrados en general tienen un péptido señal fusionado al extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma segregada o “madura” del polipéptido. En determinados modos de realización se usa el péptido señal natural, por ejemplo, un péptido señal de la cadena pesada o de la cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que conserva la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que está asociado de forma funcional a él. De forma alternativa, se puede usar un péptido señal de mamífero heterólogo o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder natural se puede sustituir por la secuencia líder del activador de plasminógeno tisular (TPA) humano o β -glucuronidasa de ratón.

El ADN que codifica una secuencia de proteínas corta que se podría usar para facilitar la purificación posterior (por ejemplo, una marca de histidina) o ayudar en el marcado de la proteína de fusión se puede incluir dentro de o en los extremos del polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o fragmentos polipeptídicos del mismo.

En otro aspecto de la invención se proporciona una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. En determinados modos de realización se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de la invención. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, descritos en el presente documento en relación con polinucleótidos y vectores, respectivamente. En un aspecto, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) un vector que comprende un polinucleótido que codifica (parte de) un anticuerpo de la invención. Como se usa en el presente documento, el término “célula huésped” se refiere a cualquier clase de sistema celular que se pueda genomanipular para generar las proteínas de fusión de la invención o fragmentos de las mismas. Las células huésped adecuadas para replicar y para soportar la expresión de moléculas de unión a antígeno son bien conocidas en la técnica. Dichas células se pueden transfectar o transducir según sea apropiado con el vector de expresión particular y se pueden cultivar grandes cantidades de células que contienen vectores para sembrar fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes de la molécula de unión a antígeno para aplicaciones clínicas. Las células huésped adecuadas incluyen microorganismos procariotas, tales como *E. coli*, o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto o similares. Por ejemplo, se pueden producir polipéptidos en bacterias, en particular cuando no se necesita glucosilación.

Después de la expresión, se puede aislar el polipéptido a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente. Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras con vías de glucosilación que se han "humanizado", dando como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004), y Li *et al.*, Nat Biotech 24, 210-215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar conjuntamente con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas). También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que están adaptadas para el cultivo en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293T como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, J Gen Virol 36, 59 (1977)), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI (como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), células MRC-5 y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO-dhfr (Urlaub *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma, tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003). Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado. En un modo de realización, la célula huésped es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfoide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). Son conocidas en la técnica las tecnologías estándar para expresar genes exógenos en estos sistemas. Se pueden genomanipular células que expresan un polipéptido que comprende la cadena pesada o bien la ligera de una inmunoglobulina para que también expresen la otra de las cadenas de inmunoglobulina de modo que el producto expresado sea una inmunoglobulina que tiene tanto una cadena pesada como una ligera.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo de la invención o fragmentos polipeptídicos del mismo, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende polinucleótidos que codifican el anticuerpo de la invención o fragmentos polipeptídicos del mismo, como se proporciona en el presente documento, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo de la invención o fragmentos polipeptídicos del mismo, y recuperar el anticuerpo de la invención o fragmentos polipeptídicos del mismo de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

En determinados modos de realización, los restos que se pueden unir específicamente a un antígeno de la célula diana (por ejemplo, fragmentos Fab) que forman parte de la molécula de unión a antígeno comprenden al menos una región variable de inmunoglobulina que se puede unir a un antígeno. Las regiones variables pueden formar parte de y derivar de anticuerpos naturales o no naturales y fragmentos de los mismos. Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos no naturales se pueden construir usando síntesis de péptidos en fase sólida, se pueden producir de forma recombinante (por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.186.567) o se pueden obtener, por ejemplo, cribando colecciones combinatorias que comprendan cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.969.108 concedida a McCafferty).

Se puede usar cualquier especie animal de inmunoglobulina en la invención. Las inmunoglobulinas no limitantes útiles en la presente invención pueden ser de origen murino, de primate o humano. Si se pretende que la proteína de fusión sea para uso en humanos, se puede usar una forma química de inmunoglobulina en la que las regiones constantes de la inmunoglobulina son de un humano. También se puede preparar una forma humanizada o completamente humana de la inmunoglobulina de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.565.332 concedida a Winter). La humanización se puede lograr mediante diversos procedimientos incluyendo, pero sin limitarse a, (a) injertar las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en regiones estructurales y constantes humanas (por ejemplo, anticuerpo receptor) con o sin conservación de residuos estructurales críticos (por ejemplo, los que son importantes para conservar buenas funciones de afinidad de unión a antígeno o de anticuerpos), (b) injertar solo las regiones determinantes de la

especificidad (SDR o a-CDR; los residuos críticos para la interacción anticuerpo-antígeno) no humanas en regiones estructurales y constantes humanas, o (c) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero "enmascararlos" con una sección similar a humana mediante el reemplazo de residuos superficiales. Los anticuerpos humanizados y procedimientos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332, 323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); las patentes de EE. UU. n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Jones *et al.*, *Nature* 321, 522-525 (1986); Morrison *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science* 239, 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994); Kashmire *et al.*, *Methods* 36, 25-34 (2005) (que describen un injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36, 43-60 (2005) (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36, 61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" para el reordenamiento de FR). Las inmunoglobulinas particulares de acuerdo con la invención son inmunoglobulinas humanas. Se pueden producir anticuerpos humanos y regiones variables humanas usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen en general en van Dijk y van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Las regiones variables humanas pueden formar parte de y derivarse de anticuerpos monoclonales humanos preparados por el procedimiento de hibridoma (véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). También se pueden preparar anticuerpos humanos y regiones variables humanas administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para que produzca anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigenica (véase, por ejemplo, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005)). También se pueden generar anticuerpos humanos y regiones variables humanas aislando secuencias de regiones variables de clones de Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de humano (véase, por ejemplo, Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); y McCafferty *et al.*, *Nature* 348, 552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352, 624-628 (1991)). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab.

En determinados aspectos, se genomanipulan los anticuerpos para que tengan una afinidad de unión potenciada de acuerdo, por ejemplo, con los procedimientos divulgados en la publicación PCT WO 2012/020006 (véanse los ejemplos relacionados con la maduración de la afinidad) o la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0132066. Se puede medir la capacidad de las moléculas de unión a antígeno de la invención para unirse a un determinante antigenico específico a través de un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o bien a través de otras técnicas conocidas por un experto en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (Liljeblad, *et al.*, *Glyco J* 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)). Se pueden usar ensayos de competencia para identificar una molécula de unión a antígeno que compite con un anticuerpo de referencia por su unión a un antígeno particular. En determinados modos de realización, dicha molécula de unión a antígeno competidora se une al mismo epítopo (por ejemplo, un epítopo lineal o uno conformacional) al que se une la molécula de unión a antígeno de referencia. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para mapear un epítopo al que se une una molécula de unión a antígeno en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods en Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). En un ensayo de competencia ejemplar, se incuba antígeno inmovilizado en una solución que comprende una primera molécula de unión a antígeno marcada que se une al antígeno y una segunda molécula de unión a antígeno no marcada que se somete a prueba para determinar su capacidad de competir con la primera molécula de unión a antígeno por su unión al antígeno. La segunda molécula de unión a antígeno puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba antígeno inmovilizado en una solución que comprende la primera molécula de unión a antígeno marcada, pero no la segunda molécula de unión a antígeno no marcada. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al antígeno, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, entonces eso indica que la segunda molécula de unión a antígeno está compitiendo con la primera molécula de unión a antígeno por su unión al antígeno. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Los anticuerpos de la invención preparados como se describe en el presente documento se pueden purificar mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores tales como carga neta, hidrofobia, hidrofilia, etc., y serán evidentes para los expertos en la técnica. Para la purificación por cromatografía de afinidad se puede usar un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une la molécula de unión a antígeno. Por ejemplo, para la purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas de fusión de la invención, se puede usar una matriz con proteína A o proteína G. Se pueden usar la cromatografía de afinidad con proteína A o G y la cromatografía de exclusión por tamaño secuenciales para aislar una molécula de unión a antígeno esencialmente como se describe en los ejemplos. Se puede determinar la pureza de la molécula de unión a antígeno o fragmentos de la misma mediante cualquiera de una variedad de procedimientos

analíticos bien conocidos, que incluyen electroforesis en gel, cromatografía de líquidos de alta presión y similares. Por ejemplo, se demostró que las moléculas de unión a antígeno que contienen 4-1BBL, expresadas como se describe en los ejemplos, estaban intactas y apropiadamente ensambladas como se demuestra mediante SDS-PAGE reductora y no reductora.

5 **Ensayos**

Las moléculas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento se pueden identificar, cribar o caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y/o sus actividades biológicas mediante diversos ensayos 10 conocidos en la técnica.

1. **Ensayos de afinidad**

15 La afinidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica proporcionada en el presente documento por el correspondiente receptor se puede determinar de acuerdo con los procedimientos expuestos en los ejemplos mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIACore (GE Healthcare) y receptores o proteínas diana tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. La afinidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica por el antígeno de célula diana se puede determinar mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), usando instrumentación estándar tal como un 20 instrumento BIACore (GE Healthcare) y receptores o proteínas diana tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. Para las moléculas de unión a antígeno CD19-4-1BBL, los procedimientos se han descrito con más detalle en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2016/075278 A1. De acuerdo con un aspecto, se mide K_D por resonancia de plasmón superficial usando un equipo BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

25 2. **Ensayos de unión y otros ensayos**

30 En un aspecto, las moléculas de unión a antígeno CD19-4-1BBL como se informa en el presente documento se someten a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno como se describe con más detalle en el ejemplo 3a.

35 3. **Ensayos de actividad**

40 En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar la actividad biológica de moléculas de unión a antígeno CD19-4-1BBL. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, inhibición de la proliferación de linfocitos B o destrucción de linfocitos B. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

45 En determinados modos de realización, se somete a prueba un anticuerpo como se describe en el presente documento para determinar dicha actividad biológica.

Composiciones farmacéuticas, formulaciones y vías de administración

50 En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-CD20/anti-CD3 y agonistas de 4-1BB proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos a continuación. En un modo de realización, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo proporcionado en el presente documento y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo proporcionado en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

55 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos biespecíficos disueltos o dispersados en un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que en general no son tóxicas para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, es decir, no producen reacciones adversas, alérgicas u otros efectos indeseables cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un humano, según corresponda. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un anticuerpo y opcionalmente un ingrediente activo adicional será conocida por los expertos en la técnica a la vista de la presente divulgación, como se exemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed. Mack 60 Printing Company, 1990, incorporado en el presente documento como referencia. En particular, las composiciones son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Como se usa en el presente documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, sales, estabilizadores y combinaciones de los mismos, como sería conocido para 65 un experto en la técnica.

Las composiciones parenterales incluyen aquellas diseñadas para administración por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para inyección, las moléculas de unión a antígeno de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De forma alternativa, las proteínas de fusión pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando las proteínas de fusión de la invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes enumerados a continuación, según se requiera. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. En general, se preparan dispersiones incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferentes son técnicas de secado al vacío o liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de un medio líquido previamente filtrado estéril del mismo. Se debe tamponar adecuadamente el medio líquido si es necesario y hacer isotónico el diluyente líquido en primer lugar antes de la inyección con solución salina o glucosada suficiente. La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe preservar de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que se debe mantener al mínimo la contaminación por endotoxinas hasta un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilmonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o benzílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenenglicol (PEG). Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener compuestos que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones inyectables oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleatos de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Se pueden atrapar ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de polí(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (18.^a ed. Mack Printing Company, 1990). Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. En determinados modos de realización, se puede conseguir una absorción prolongada de una composición inyectable mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión intersticial del fármaco tales como glucoproteínas hialuronidas activas a pH neutro solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas hialuronidas PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanas adicionales tales como condroitinas.

Se describen formulaciones de anticuerpos liofilizadas ejemplares en la patente de EE. UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586 y en el documento WO 2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón acetato-histidina.

Además de las composiciones descritas previamente, los anticuerpos biespecíficos también se pueden formular como una preparación de liberación lenta. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, las proteínas de fusión se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente

solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

- Las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a antígeno de la invención se pueden fabricar por medio de procedimientos de mezclado, disolución, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o coadyuvantes fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de las proteínas en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.
- 10 El anticuerpo biespecífico de la invención se puede formular en una composición en forma de ácido o base libre, neutra o sal. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que conservan sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Estas incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteínica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o dichos ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las correspondientes formas de base libre.
- 15 20 La composición en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma adversa entre sí. Dichos ingredientes activos están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.
- 25 30 35 En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un segundo medicamento que comprende un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 como se describe en este documento. En un aspecto particular, la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento de trastornos proliferativos de linfocitos B, en particular una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de zona marginal (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH).
- Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son en general estériles. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Administración del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y el agonista de 4-1BB

- Tanto el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 como el agonista de 4-1BB (ambos llamados sustancia en el presente documento) se pueden administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, administración intralesional. Sin embargo, los procedimientos de la presente invención son en particular útiles en relación con agentes terapéuticos que se administran por infusión parenteral, en particular intravenosa.
- 45 50 55 60 65 Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos temporales, administración en inyección intravenosa rápida e infusión intermitente. En un modo de realización, el agente terapéutico se administra por vía parenteral, en particular por vía intravenosa. En un modo de realización particular, la sustancia se administra mediante infusión intravenosa. En otro aspecto, la sustancia se administra por vía subcutánea.
- Tanto el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 como el agonista de 4-1BB se formularían, dosificarían y administrarían de una manera consecuente con las buenas prácticas médicas. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los médicos. Aunque no es necesario, tanto el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 como el agonista de 4-1BB se formulan opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de agente terapéutico presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y por las mismas vías de administración que se describen en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empírica/clínicamente como apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y el agonista de 4-1BB (cuando se usan en combinación o con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de agente 4-1BB, la gravedad y evolución de la enfermedad, si ambos agentes se administran con propósitos preventivos o terapéuticos, tratamiento previo, anamnesis del paciente y respuesta al agente terapéutico y el criterio del médico especialista.

Cada sustancia se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg - 10 mg/kg) de la sustancia puede ser una dosificación candidata inicial para su administración al sujeto, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, en general, se prolongaría el tratamiento hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar de cada sustancia estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, se pueden administrar al sujeto una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de manera intermitente, por ejemplo, cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el sujeto reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del agente terapéutico). Se puede administrar una dosis de carga inicial mayor, seguida de una o más dosis menores, o una dosis inicial menor, seguida de una o más dosis mayores. Una pauta de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 10 mg, seguida de una dosis bisemanal de aproximadamente 20 mg de agente terapéutico. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. La progresión de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

En un aspecto, la administración tanto del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 como del agonista de 4-1BB es una única administración. En determinados aspectos, la administración del agente terapéutico consta de dos o más administraciones. En uno de dichos aspectos, las sustancias se administran cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas, en particular cada dos semanas. En un aspecto, la sustancia se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. En un aspecto, la sustancia se administra a una dosis de aproximadamente 50 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, aproximadamente 200 µg/kg, aproximadamente 300 µg/kg, aproximadamente 400 µg/kg, aproximadamente 500 µg/kg, aproximadamente 600 µg/kg, aproximadamente 700 µg/kg, aproximadamente 800 µg/kg, aproximadamente 900 µg/kg o aproximadamente 1000 µg/kg. En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 se administra a una dosis que es mayor que la dosis del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 en un régimen de tratamiento correspondiente sin la administración del agonista de 4-1BB. En un aspecto, la administración del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende una administración inicial de una primera dosis del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3, y una o más administraciones posteriores de una segunda dosis del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3, en el que la segunda dosis es mayor que la primera dosis. En un aspecto, la administración del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende una administración inicial de una primera dosis del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3, y una o más administraciones posteriores de una segunda dosis del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3, en el que la primera dosis no es menor que la segunda dosis.

En un aspecto, la administración del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 en el régimen de tratamiento de acuerdo con la invención es la primera administración del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 al sujeto (al menos dentro de la misma pauta de tratamiento). En un aspecto, no se realiza ninguna administración del agonista de 4-1BB al sujeto antes de la administración del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3. En otro aspecto, el agonista de 4-1BB se administra antes de la administración del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3.

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 se usa para su combinación con un agonista de 4-1BB (CD137) que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19, en el que se realiza un pretratamiento con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferentemente obinutuzumab, antes de la politerapia, en el que el período de tiempo entre el pretratamiento y la politerapia es suficiente para la reducción de los linfocitos B en el individuo en respuesta al anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferentemente obinutuzumab.

La activación de los linfocitos T puede dar lugar a un síndrome de liberación de citocinas (SLC) grave. En un estudio de fase 1 realizado por TeGenero (Suntharalingam *et al.*, N Engl J Med (2006) 355,1018-1028), los 6 voluntarios sanos experimentaron un síndrome de liberación de citocinas (SLC) grave casi mortal, inmediatamente después de la infusión de un anticuerpo monoclonal anti-CD28 superagonista estimulador de linfocitos T en dosis inapropiadas. La liberación de citocinas asociada con la administración de un agente terapéutico activador de linfocitos T, tal como el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3, a un sujeto se puede reducir significativamente mediante el pretratamiento de dicho sujeto con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, tal como obinutuzumab. El uso del pretratamiento con GAZYVA® (Gpt) debería ayudar en la rápida disminución de los linfocitos B, tanto en la sangre periférica como en los órganos linfoides secundarios, de modo que el riesgo de acontecimientos adversos (AA) altamente relevantes debido a una fuerte activación sistémica de los linfocitos T por agentes terapéuticos activadores de linfocitos T (por ejemplo, SLC) se reduce, mientras se mantienen los niveles de exposición de

agentes terapéuticos activadores de linfocitos T cuyas dosis son lo suficientemente altas desde el inicio de la dosificación como para mediar en la eliminación de células tumorales. Hasta la fecha, el perfil de seguridad del obinutuzumab (incluyendo la liberación de citocinas) se ha evaluado y manejado en cientos de pacientes en ensayos clínicos de obinutuzumab en desarrollo. Finalmente, además de respaldar el perfil de seguridad de los agentes terapéuticos activadores de linfocitos T tal como el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3, Gpt también debería ayudar a prevenir la formación de anticuerpos antifármaco (ADA) para estas moléculas únicas.

En la presente invención, la combinación del anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y el agonista de 4-1BB se puede usar en combinación con uno o más agentes adicionales en un tratamiento. Por ejemplo, se puede coadministrar al menos un agente terapéutico adicional. En determinados aspectos, un agente terapéutico adicional es un agente inmunoterápico.

En un aspecto de la invención, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 es para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 se usa en combinación con un agonista de 4-1BB (CD137) que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19, y adicionalmente se combinan con un agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1. Un agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un antagonista de unión a PD-L1 o un antagonista de unión a PD-1. En particular, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1.

En un aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1. El término “**PD-L1**”, también conocido como CD274 o B7-H1, se refiere a cualquier PD-L1 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos), primates no humanos (por ejemplo, macacos cangrejeros) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), en particular a “PD-L1 humano”. La secuencia de aminoácidos de PD-L1 humano completo se muestra en UniProt (www.uniprot.org), n.º de acceso Q9NZQ7 (SEQ ID NO: 106). El término “**antagonista de unión a PD-L1**” se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1. En algunos modos de realización, un antagonista de la unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunos modos de realización, los antagonistas de la unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1. En un modo de realización, un antagonista de la unión a PD-L1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras con respecto al reconocimiento antigénico). En particular, un antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. El término “**anticuerpo anti-PD-L1**” o “anticuerpo de unión a PD-L1 humano” o “anticuerpo que se une específicamente a PD-L1 humano” o “anti-PD-L1 antagonista” se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de PD-L1 humano con una afinidad de unión con un valor de KD de $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l o menor, en un aspecto con un valor de KD de $1,0 \times 10^{-9}$ mol/l o menor. La afinidad de unión se determina con un ensayo de unión estándar, tal como la técnica de resonancia de plasmón superficial (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Suecia).

En un aspecto específico, el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en atezolizumab (MPDL3280A, RG7446), durvalumab (MEDI4736), avelumab (MSB0010718C) y MDX-1105. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105, descrito en el presente documento. Todavía en otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736 (durvalumab). Aún en otro aspecto, un anticuerpo anti-PD-L1 es MSB0010718C (avelumab). Más en particular, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es atezolizumab (MPDL3280A). En otro aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende un dominio variable de la cadena pesada VH(PDL-1) de SEQ ID NO: 108 y un dominio variable de la cadena ligera VL(PDL-1) de SEQ ID NO: 109. En otro aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende un dominio variable de la cadena pesada VH(PDL-1) de SEQ ID NO: 110 y un dominio variable de la cadena ligera VL(PDL-1) de SEQ ID NO: 111.

El término “**PD-1**”, también conocido como CD279, PD1 o proteína 1 de muerte celular programada, se refiere a cualquier PD-L1 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos), primates no humanos (por ejemplo, macacos cangrejeros) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), en particular a la proteína humana PD-1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en UniProt (www.uniprot.org), n.º de acceso Q15116 (SEQ ID NO: 107). El término “**antagonista de unión a PD-1**” se refiere a una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión a ligando. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L2. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 tanto a PD-L1 como a PD-L2. En particular, un antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. El término “**anticuerpo anti-PD-1**” o “anticuerpo de unión a PD-1 humano” o

"anticuerpo que se une específicamente a PD-1 humano" o "anti-PD-1 antagonista" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de PD-L1 humano con una afinidad de unión con un valor de KD de $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l o menor, en un aspecto con un valor de KD de $1,0 \times 10^{-9}$ mol/l o menor. La afinidad de unión se determina con un ensayo de unión estándar, tal como la técnica de resonancia de plasmón superficial (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Suecia).

En un aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un aspecto específico, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en MDX 1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), CT-011 (pidilizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 y BGB-108, en particular de pembrolizumab y nivolumab. En otro aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende un dominio variable de la cadena pesada VH(PD-1) de SEQ ID NO: 112 y un dominio variable de la cadena ligera VL(PD-1) de SEQ ID NO: 113. En otro aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende un dominio variable de la cadena pesada VH(PD-1) de SEQ ID NO: 114 y un dominio variable de la cadena ligera VL(PD-1) de SEQ ID NO: 115.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso la administración del agente terapéutico se puede producir antes de, simultáneamente a y/o después de la administración del agente o agentes terapéuticos adicionales. En un modo de realización, la administración del agente terapéutico y la administración de un agente terapéutico adicional se producen en un intervalo de aproximadamente un mes, o de aproximadamente una, dos o tres semanas, o de aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí.

Procedimientos y composiciones terapéuticos

CD20 y CD19 se expresan en la mayoría de los linfocitos B (marcador universal de linfocitos B) con la excepción de las células madre y las células plasmáticas, y con frecuencia se expresan en la mayoría de las neoplasias malignas humanas de linfocitos B (antígeno asociado a tumores), tales como el linfoma y las leucemias, excepto el mieloma múltiple, por ejemplo, en el linfoma no Hodgkin y en la leucemia linfocítica aguda.

Los anticuerpos biespecíficos que reconocen dos proteínas de la superficie celular en diferentes poblaciones celulares ofrecen la posibilidad de redirigir a las células inmunitarias citotóxicas para la destrucción de las células diana patógenas.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD20/anti-CD3 y un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19.

En uno de dichos aspectos, el procedimiento comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. En otros modos de realización, se proporciona en el presente documento un procedimiento para reducir los linfocitos B que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD20/anti-CD3 y un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19. Un "individuo" o un "sujeto" de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, es preferentemente un humano.

En otros aspectos, se proporciona una composición para su uso en inmunoterapia contra el cáncer que comprende un anticuerpo anti-CD20/anti-CD3 y un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19. En determinados modos de realización, se proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-CD20/anti-CD3 y un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 para su uso en un procedimiento de inmunoterapia contra el cáncer.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento el uso de una composición que comprende un anticuerpo anti-CD20/anti-CD3 y un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 en la fabricación o preparación de un medicamento. En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento de un trastorno proliferativo de linfocitos B. En otro modo de realización, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno proliferativo de linfocitos B que comprende administrar a un individuo que tiene un trastorno proliferativo de linfocitos B una cantidad eficaz del medicamento. En uno de dichos modos de realización, el procedimiento comprende adicionalmente la administración al individuo de una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional.

En otro modo de realización, el medicamento es para reducir los linfocitos B. Los trastornos proliferativos de linfocitos B se seleccionan del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de zona marginal (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH). En un aspecto particular, el cáncer de linfocitos B es linfoma no Hodgkin o leucemia linfocítica aguda.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un procedimiento para tratar un cáncer de linfocitos B.

- En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene dicho cáncer de linfocitos B una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD19 humano. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe a continuación. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un humano. El cáncer de linfocitos B es, en un modo de realización, un linfoma de linfocitos B o una leucemia de linfocitos B. En un modo de realización, el cáncer de linfocitos B es linfoma no Hodgkin o leucemia linfocítica aguda.
- Las politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso la administración del anticuerpo como se informa en el presente documento se puede producir antes de, simultáneamente a y/o después de la administración del agente o agentes terapéuticos adicionales. En un modo de realización, la administración del anticuerpo anti-CD19 humano y la administración de un agente terapéutico adicional se producen en un intervalo de aproximadamente un mes, o de aproximadamente una, dos o tres semanas, o de aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí.
- Tanto el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 como el agonista de 4-1BB como se informa en el presente documento (y cualquier agente terapéutico adicional) se pueden administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos temporales, administración en inyección intravenosa rápida e infusión intermitente.
- Tanto el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 como el agonista de 4-1BB como se informa en el presente documento se formularían, dosificarían y administrarían de una manera consecuente con las buenas prácticas médicas. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los médicos. Aunque no es necesario, los anticuerpos se formulan opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos presentes en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y por las mismas vías de administración que se describen en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empírica/clínicamente como apropiada.
- Otros agentes y tratamientos**
- Las moléculas de unión a antígeno de la invención se pueden administrar en combinación con uno o más de agentes en tratamiento. Por ejemplo, se puede coadministrar una proteína de fusión de la invención con al menos un agente terapéutico adicional. El término "agente terapéutico" engloba cualquier agente que se puede administrar para tratar un síntoma o enfermedad en un individuo que necesita dicho tratamiento. Dicho agente terapéutico adicional puede comprender cualquier ingrediente activo adecuado para la indicación particular que se está tratando, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. En determinados modos de realización, un agente terapéutico adicional es otro agente antineoplásico.
- Dichos otros agentes están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de proteína de fusión usada, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Las moléculas de unión a antígeno se usan, en general, en las mismas dosificaciones y por las mismas vías de administración que se describen en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empírica/clínicamente como apropiada.
- Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma composición o en composiciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso la administración de las moléculas de unión a antígeno de la invención se puede producir antes de, simultáneamente a y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante.
- Artículos de fabricación (kits)**
- En otro aspecto de la invención se proporciona un kit que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El kit comprende un recipiente y una ficha técnica o

prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que por sí misma o combinada con otra composición es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón que sea perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos dos agentes activos en el kit son un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente al CD19 de la invención.

10 En un aspecto particular, se proporciona un kit para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un sujeto, que comprende un envase que comprende (A) una primera composición que comprende como ingrediente activo un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable; (B) una segunda composición que comprende como ingrediente activo un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y (C) instrucciones para el uso de las composiciones en una politerapia.

15 La ficha técnica o prospecto del envase indica cómo se usa la composición para tratar la afección elegida y proporciona las instrucciones para el uso de las composiciones en una politerapia. Además, el kit puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente al CD19 de la invención. Además, el kit puede comprender uno o más recipientes adicionales que comprenden ingredientes activos adicionales que se pueden usar en combinación. El artículo de fabricación en este modo de realización de la invención puede comprender además un prospecto del envase que indique que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular.

20 De forma alternativa o adicionalmente, el kit puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Tabla D (Secuencias):

SEQ ID NO:	Denominación	Secuencia
1	4-1BBL (71-254) humano (hu)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQIELRRVVAGEGSGSVSLAI.III.QPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLIII.SAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSE
2	4-1BBL hu (85-254)	LDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEA RNNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
3	4-1BBL hu (80-254)	DPAGL.LDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR DPAGL.LDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR
4	4-1BBL hu (52-254)	PWAVSGARASPGASAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSG SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

5	4-1BBL (71-248) humano (hu)	REGPELSPDDPAGL.LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGL.SYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQI.EI.RRVVAGEGSGSVSLAL.III.QPL.RSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
6	4-1BBL hu (85-248)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEI.RRVVAG EGSGSVSLAL.III.QPL.RSAAGAAA.IALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLJILSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
7	4-1BBL hu (80-248)	DPAGL.LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGGSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEI.RR VVAGEGSGSVSLAL.HLQPLRSAAGAAA.ALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
8	4-1BBL hu (52-248)	PWAWS GARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGL.LDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQI.EI.RRVVAGEGSG SVSLAL.HLQPLRSAAGAAA.ALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGL
9	CD19(8B8-018) CDR-H1	DYIMH
10	CD19(8B8-018) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
11	CD19(8B8-018) CDR-H3	GTYYYGSALFDY
12	CD19(8B8-018) CDR-L1	KSSQSLENPNGNTYLN
13	CD19(8B8-018) CDR-L2	RVSKRFS
14	CD19(8B8-018) CDR-L3	LQLTHVPYT
15	CD19(8B8-2B11) CDR-H1	DYIMH
16	CD19(8B8-2B11) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
17	CD19(8B8-2B11) CDR-H3	GTYYYGPQLFDY
18	CD19(8B8-2B11) CDR-L1	KSSQSLETSTGTTYLN
19	CD19(8B8-2B11) CDR-L2	RVSKRFS
20	CD19(8B8-2B11) CDR-L3	LQLLEDPYT
21	CD19(8B8-018) VH	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWQGQTTTVVSS
22	CD19(8B8-018) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNTYL NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRI'SGVPDRI'SGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGKLEIK
23	CD19(8B8-2B11) VH	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMEI.SRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP QLFDYWQGQTTTVVSS
24	CD19(8B8-2B11) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLN NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCLQLLEDPYTFGQGKLEIK

25	4-1BBL hu (71-254) dimérico conectado mediante conector (G4S) ₂	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VIIIITEARARIIAWQLTQGATVGLI.FRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDIDPAGLI.IJLRQGM IAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFIQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
26	4-1BBL hu (85-254) dimérico conectado mediante conector (G4S) ₂	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGS LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
27	4-1BBL hu (80-254) dimérico conectado mediante conector (G4S) ₂	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSG GGGSDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
28	4-1BBL hu (52-254) dimérico conectado mediante conector (G4S) ₂	PWAVSGARASPGSAASPRRLREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSG SVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGSPWAV SGARASPGSAASPRRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF AQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
29	4-1BBL hu (71-248) dimérico conectado mediante conector (G4S) ₂	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA

			ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLDDRQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLEI.RRVVAGEGSGSVSLALII.QP LRSAAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGL
30	4-1BBL hu (85-248) dimérico conectado mediante conector (G4S) ₂		LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGSDLRQ GMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS YKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGA TVLGLFRVTPEIPAGL
31	4-1BBL hu (80-248) dimérico conectado mediante conector (G4S) ₂		DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGSD PAGLDDRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPA SSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
32	4-1BBL hu (52-248) dimérico conectado mediante conector (G4S) ₂		PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLDDR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEI.RRVVAGEGSG SVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLIII.SAGQRLGVIII.IITEGRARIIAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGSPWA VSGARA SPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLJ.DLRQGMFAQLV AQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL LVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGL
33	cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)		QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKASGYFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWQGQTIVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVITFP QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNWKPSNTKV DKKVEPKSCDKTIITCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DILMISRTPEVTCVVVDVSHDPEVKFNWYVDGVE VHNAAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQP REPVQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KITPPVLDSDGSFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

34	cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLENPNGNTYL NWYLQKPGQSPQLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
35	cadena de botón Fc de 4-1BBL hu (71-254)-CL* dimérico	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLYSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGM FAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLYSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGSRVAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKHTCPC PAPEAAGGPSVFLPPPDKTLMSRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
36	4-1BBL hu (71-254)-CH1* monomérico	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLYSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VIII.IIITEARARIIAWQLTQGATVI.GLF.RVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGASTKGPSVTP LAPSSKSTSGGT AALGCLVEDYFPEPVTSWNNSGALTSGVHTPAVLQ SSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD EKVEPKSC
37	cadena de botón Fc de 4-1BBL hu (71-254)-CL dimérico	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLYSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGREGPELSPDDPAGLLDLRQGM I'AQI.VAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLYSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARIIAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGSRVAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKHTCPC

		PAPEAAGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SIIEDPEVKFNWYVDGVEVIINAKTPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMIIEALIINIYTQKSLSLSP GK
38	4-1BBL hu (71-254)-CH1 monomérico	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSC
39	cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8- 018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWQGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK DKKVEPKSCDKTHCPPCPAPEAAGGPSVFLPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGSGREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDP LAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGG GSGGGGSGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTPE EIPAGLPSPRSE
40	ligando monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8- 018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWQGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK DKKVEPKSCDKTHCPPCPAPEAAGGPSVFLPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV

		MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGREGPELS PDDPAGLQLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDP GLAGVSI.TGGLSYKEDTKEL.VVAKAGVYYVFFQLEI. RRVVAGEGSGSVSIALIIT.QPLRSAAGAAAALTVDL. PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLSPRSE
41	cadena de botón Fc de 4-1BBL hu (71-248)-CL* dimérico	REGPELSPDDPAGLQLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAEGSGSVSIALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLG GGGSGGGSREGPELSPDDPAGLQLDLRQGMFAQLVA QNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAEGSGSVSIALHLQP RSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLGGGGSGGGSRVVAAPSVFIFPPSDRKLS GTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPCPAPEAAGGPSVF LFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
42	4-1BBL hu (71-248)-CH1* monomérico	REGPELSPDDPAGLQLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAEGSGSVSIALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLG GGGSGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VEDYIPLPVTVSWNSGALTSGVHTPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDEKVEPKSC
43	cadena de botón Fc de 4-1BBL hu (71-248)-CL dimérico	REGPELSPDDPAGLQLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAEGSGSVSIALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLG GGGSGGGSREGPELSPDDPAGLQLDLRQGMFAQLVA QNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAEGSGSVSIALHLQP RSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLGGGGSGGGSRVVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPCPAPEAAGGPSVF LFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV

		YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
44	4-1BBL hu (71-248)-CH1 monomérico	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VIII.IITEGRARIIAWQL.TQGATVLGI.FRVTPEIPAGI.G GGGSGGGSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAIGCL VKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SC
45	cadena (71-248) de ligando dimérico de ojal Fc anti- CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWQGTTTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGYPSDIAVEWESNGQ PENNY KTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG VYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG AAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG L
46	ligando (71-248) monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWQGTTTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVQYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL

		PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
47	cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYGP QLFDYWQGTTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYZFPEPVTWSWNSGALTSGVHTPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVQCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KITPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	cadena ligera CD19(8B8-2B11)	DIVMTQTPLSLSVTGQPASICKSSQSLTSTGTTYL NWYLQKPGQSPQLIYRVSKRFGVPDRFGSGSGTD FTLKISRVEADVGVYYCLQLEDPYTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIEPPSDEQLKSGTASV р VCLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
49	cadena (71-254) de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYGP QLFDYWQGTTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYZFPEPVTWSWNSGALTSGVHTPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVQCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KITPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDP LAGVSLTGGSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEG GGGGGGSGREGPELSPDDPAGLDDRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT EIPAGLPSPRSE
50	ligando (71-254) monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYGP QLFDYWQGTTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYZFPEPVTWSWNSGALTSGVHTPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK

		DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KITPPVLDSDGSIFIYSKLTVDKSRWQQGNVI'SCSV MIEAI.IINTIYTQKSI.SI.SPGGGGSGGGSGREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVQNVLJ.IDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLSPRSE
51	cadena (71-248) de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP QLFDYWQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPavl QSSGLYSLSSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFAQPSDIAVEWESNGQPENNY KITPPVLDSDGSFFLVSKLTVDSRWWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVQNVLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVQNVLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG VYYVFFQLELRRVVAEGSGSVSLALHLQPLRSAAG AAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG L
52	ligando (71-248) monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP QLFDYWQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPavl QSSGLYSLSSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KITPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVQNVLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL

53	cadena de botón Fc de 4-1BBL hu (71-254) trimérico	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGM FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGIFRVTPLEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSP DDPAGLI.DLRQGMFAQLVAQNVLL.IDGPL.SWYSDP GLAGVSI.TGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEI RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLL.II.SAGQRL.GVIII.II.TEAR ARI.IA.WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGSPG SSSSGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPCRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
54	cadena de botón Fc anti-CD19(8B8-018) fusionada con 4-1BBL hu (71-254) trimérico	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWQGQTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPABL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVIFCSV MIEALIINIYTQKSL.II.SPGGGGGSGGGGSREGPEI.S PDDPAGI.DLRQGMFAQLVAQNVLL.IDGPL.SWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEI RRVVAGEGSGSVSL.III.QPL.RSAAGAAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLL.II.SAGQRL.GVIII.II.TEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEG GGGGGGSGGGPEI.SPDDPAGLL.DLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT EIPAGLPSPRSEGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG REGPELSPDDPAGLL.DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLE LRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL TQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

55	cadena de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11) fusionada con 4-1BBL hu (71-254) trimérico	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP QLFDYWQGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDVFPEPVTWVNNSGALTSGVHTFPABL QSSGLYSLSSVTVPSQLGTQTYICNVNPKSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKAI.GAPIEKTISKAKGQPREGQVYTLPPCR DELTQNQVSI.WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTIAPPVLSDGSITFLYSKLTVDKSRWQQGNVIFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLILDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVII.FQLEL RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLJII.SAGQRLGVIII.II.TEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEG GSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLI.IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVII.FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLJ.IHS AGQRLGVHLI.TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPE EIPAGLPSPRSEGEGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLILDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLI.TEARARHAWQL TQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
56	CD3-HCDR1	TYAMN
57	CD3-HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
58	CD3-HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
59	CD3-LCDR1	GSSTGAVTTSNYAN
60	CD3-LCDR2	GTNKRAP
61	CD3-LCDR3	ALWYSNLWV
62	CD3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRTI SRDDSKNTLYLQMNSI.RAEDTAVYYCVRHGNFGNS YVSWFAYWGQGTIVTSS
63	CD3 VL	QAVVTQEPLTVSPGGTVLTGSSTGAVTTSNYAN WVQEKGQAFRGLI.GGGTNKRAPGTPARFSGSLI.GGK AALTLSGAQPEDEALEYYCALWYSNLWVFGGGTFLT VL
64	CD20-HCDR1	YSWIN
65	CD20-HCDR2	RIFPGDGTDYNGKFK
66	CD20-HCDR3	NVFDGYWLVY
67	CD20-LCDR1	RSSKSLLHSNGITYLY
68	CD20-LCDR2	QMSNLVS
69	CD20-LCDR3	AQNLELPYT

70	CD20 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWIN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLTVVSS
71	CD20 VL	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLY WYLQKPGQSPQLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIK RTV
72	cadena de ojal Fc DP47	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSGFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTP REEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTIKAKGQPREGQVCTLPPSRDELTKNQV SLSACAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN YTQKSLSLSPGK
73	cadena ligera DP47	EIVLTQSPGTLSSLPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFILT ISRLEPEDFAVYYCQQYQSSPLTFQGQTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKAD YEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
74	cadena de ojal Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu (71-254) dimérico	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTIKAKGQPREGQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LSDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGSGGGSGGGSGGG LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGG SREGPELSPDDPAGLLDRQGMFAQLVAQNVLLIDG PLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGL PSPRSE

75	cadena de botón Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu (71-254) monomérico	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGGGGSGREGPELSPDDPAG LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
76	CD20 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (botón, P329G LALA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWIN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT A ALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDE KVEPKSCDGGGGGGGGSQAVVTQEPLTVSPGGTV TLTCGSSTGAVTITSNYANWVQEKGQAFRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVII TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
77	CD20 VH-CH1(EE)-Fc (ojal, P329G LALA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWIN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT A ALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDE KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSRDE LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
78	CD20 VL-CL(RK)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPAISCRSSKSLLIHSNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTD

		FTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
79	CD3 VH-CL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNS YVSWFAYWGQGTLVTVSSAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKIIKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
80	CD19	n.º de acceso de UniProt P15391
81	CD20	n.º de acceso de UniProt P11836
82	anti-CD20 B-Ly1 VH murino	GPELVKPGASVKISCKASGYAFSYSWMNWWKLRPG QGLEWIGRIFPGDGDTDYNGKFKGKATLTADKSSNT AYMQLTSLTSVDSAVALCARNVFDGYWLVYWGQG TLTVSA
83	anti-CD20 B-Ly1 VL murino	NPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQ SPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSSSGSGTDFLRISRVEA EDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKLEIKR
84	CD3ε humano	n.º de acceso de UniProt P07766
85	CD3ε de macaco cangrejero	n.º GenBank de NCBI BAB71849.1
86	4-1BBL de longitud completa	UniProt n.º P41273
87	4-1BBL (50-254)	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFIGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL TQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
88	4-1BB humano	n.º de acceso de UniProt Q07011
89	4-1BB murino	n.º de acceso de UniProt P20334
90	4-1BB de macaco cangrejero	n.º de acceso de UniProt F6W5G6
91	conector peptídico G4S	GGGGS
92	(G4S)2	GGGGSGGGGS
93	(SG4)2	SGGGGSGGGG
94	conector peptídico	GGGGSGGGGSGGGG
95	conector peptídico	GSPGSSSSGS
96	conector peptídico (G4S) ₃	GGGGSGGGGS ₃ GGGS ₃
97	conector peptídico (G4S) ₄	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
98	conector peptídico	GSGSGSGS
99	conector peptídico	GSGSGNGS
100	conector peptídico	GGSGSGSG
101	conector peptídico	GGSGSG
102	conector peptídico	GGSG
103	conector peptídico	GGSGNGSG
104	conector peptídico	GGNGSGSG

105	conector peptídico	GGNGSG
106	PD-L1 humano (Uniprot n. ^º Q9NZQ7)	MRIFAVFIFMTYWHLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNM TIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEED LKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDA GVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD PVTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSDDHQVLSGKTTTT NSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENH TAELVIPELPLAHPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIF RLRKGRMMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
107	PD-1 humano (Uniprot n. ^º Q15116)	MQIPQAPWPVVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPNPP TISPALLVVTEGDNATITCSFSNTSESIVLNWYRMSP SNQTDKLAAPPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFIIM SVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVT ERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGS VLLVVVLAIVCSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVP VFSVDYGEELDFWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVIP SGMGTSPPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL
108	VH (PD-L1)	EVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIH VRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF'DY WGQGTIVTVSS
109	VL (PD-L1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASI'LYSGVPSRISGSGSGTDFITLT ISSLPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKEIK
110	VH (PD-L1)	EVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGE LAFDYWGQGTIVTVSS
111	VL (PD-L1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRI'SGSGSGTDFITLT ISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLWTFGQGTKEIK
112	VH (PD-1)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFNYYMY WVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTL TTDSSTTAYMELKSLQFDVTAVYYCARRDYRFDM GFDYWGQGTIVTVSS
113	VL (PD-1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLH WYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKEIK
114	VH (PD-1)	QVQLVESGGVVQPGRSRLDCKASGITFSNSGMHW VRQAPGKGLEWVAIWYDGSKRYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWQ GTLTVSS
115	VL (PD-1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARI'SGSGSGTDFITLT ISLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTEFGQGTKEIK

La información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas se da en: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de cadenas de anticuerpos están numerados y se mencionan de acuerdo con los sistemas de numeración de acuerdo con Kabat

5 Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) como se define anteriormente.

Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones de la invención. Se entiende que se pueden poner en práctica otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular ADN como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general sobre las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina humana se proporciona en: Kabat, E.A. *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta ed., publicación NIH n.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

S'EST FAIT

20 Se generaron segmentos de genes deseados por PCR usando moldes apropiados o bien se sintetizaron por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR por síntesis génica automatizada. En casos donde no estaba disponible ninguna secuencia génica exacta, se diseñaron cebadores oligonucleotídicos en base a las secuencias de los homólogos más cercanos y se aislaron los genes por RT-PCR del ARN procedente del tejido apropiado. Se clonaron segmentos génicos flanqueados por sitios de escisión de endonucleasas de restricción singulares en vectores de clonación/secuenciación estándar. Se purificó el ADN plasmídico de bacterias transformadas y se determinó la concentración por espectroscopia UV. Se confirmó la secuencia de ADN de los fragmentos génicos subclonados por secuenciación de ADN. Se diseñaron segmentos génicos con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los respectivos vectores de expresión. Se diseñaron todas las construcciones con una secuencia de ADN del extremo 5' que codifica un péptido líder que dirige las proteínas para su secreción en células eucariotas.

25

30

Técnicas de cultivo celular

35 Se usaron técnicas de cultivo celular estándar como se describe en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Purificación de proteínas

Se purificaron proteínas a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados en referencia a los protocolos estándar. En resumen, se aplicaron anticuerpos a una columna de proteína A Sepharose (GE Healthcare) y se lavaron con PBS. La elución de los anticuerpos se logró a pH 2,8, seguido de neutralización inmediata de la muestra. La proteína agregada se separó de los anticuerpos monoméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200; GE Healthcare) en PBS o en histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0. Se combinaron las fracciones de los anticuerpos monoméricos, se concentraron (si era necesario) usando, por ejemplo, un concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), se congelaron y se almacenaron a -20 °C o -80 °C. Parte de las muestras se proporcionaron para el análisis de proteínas posterior y la caracterización analítica, por ejemplo, mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o espectrometría de masas.

SDS-PAGE

50 El sistema de gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen Corp.) se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se usaron geles NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast al 10 % o 4-12 % (pH 6,4) y un MES NuPAGE® (geles en condiciones reductoras, con aditivo de tampón de migración NuPAGE® Antioxidant) o tampón de migración MOPS (geles en condiciones no reductoras).

Cromatografía de exclusión por tamaño analítica

60 Se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para la determinación de la agregación y del estado oligomérico de los anticuerpos por cromatografía HPLC. En resumen, se aplicaron anticuerpos purificados por proteína A a una columna Tosoh TSKgel G3000SW en NaCl 300 mM, KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM, pH 7,5 en un sistema Agilent HPLC 1100 o en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en PBS 2 veces en un sistema HPLC Dionex. Se cuantificó la proteína eluida por absorbancia UV e integración de áreas de picos. BioRad Gel Filtration Standard 151-1901 sirvió como patrón.

Espectrometría de masas

Esta sección describe la caracterización de los anticuerpos multiespecíficos con intercambio VH/VL (VH/VL CrossMabs), con hincapié en su correcto ensamblaje. Las estructuras primarias esperadas se analizaron mediante 5 espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESI-MS) de los CrossMab intactos desglucosilados y los CrossMab desglucosilados/digeridos con plasmina o, de forma alternativa, desglucosilados/digeridos con LysC limitada.

Los CrossMab VH/VL se desglucosilaron con N-glucosidasa F en un tampón fosfato o Tris a 37 °C durante hasta 10 17 h a una concentración de proteína de 1 mg/ml. Las digestiones con plasmina o LysC limitada (Roche) se realizaron con 100 µg de CrossMab VH/VL desglucosilados en un tampón Tris pH 8 a temperatura ambiente durante 120 horas y a 37 °C durante 40 min, respectivamente. Antes de la espectrometría de masas, las muestras 15 se desalaron por medio de HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa total se determinó por medio de ESI-MS en un sistema de EM maXis 4G UHR-QTOF (Bruker Daltonik) equipado con una fuente TriVersa NanoMate (Advion).

Determinación de la unión a y afinidad de unión de anticuerpos multiespecíficos por los antígenos respectivos usando resonancia de plasmón superficial (SPR) (BIACORE)

20 La unión de los anticuerpos generados a los antígenos respectivos se investiga mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). En resumen, para las mediciones de afinidad se inmovilizan anticuerpos de cabra contra IgG humana, JIR 109-005-098, en un chip CM5 por medio de acoplamiento de aminas para la presentación de los anticuerpos contra el antígeno respectivo. La unión se mide en tampón HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005 %, pH 7,4), a 25 °C 25 (o de forma alternativa a 37 °C). Se añadió antígeno (R&D Systems o purificado localmente) en diversas concentraciones en solución. La asociación se midió mediante una inyección de antígeno de 80 segundos a 3 minutos; la disociación se midió lavando la superficie del chip con tampón HBS durante 3-10 minutos y se estimó el valor de KD usando un modelo de unión 1:1 de Langmuir. Los datos de control negativo (por ejemplo, curvas de 30 tampón) se restan de las curvas de muestra para la corrección de la deriva intrínseca respecto al valor de referencia del sistema y para la reducción de la señal de ruido. El programa informático de evaluación de Biacore respectivo se usa para el análisis de sensogramas y para el cálculo de datos de afinidad.

Ejemplo 1

35 Preparación, purificación y caracterización de moléculas de unión a antígeno CD19-41BBL

Se prepararon moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigido a CD19 como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2016/075278 A1.

40 En particular, se prepararon las siguientes moléculas:

a) Moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB monovalente dirigido y no dirigido a CD19

45 Se subclonó un polipéptido que codifica un ligando dimérico de 4-1BB fusionado al dominio CL humano en fase con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant, Zhu *et al.* 1998). Se fusionó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando de 4-1BB al dominio CH1 de IgG1 humana. Para mejorar el emparejamiento correcto, en la construcción 3.4 se introdujeron adicionalmente las siguientes 50 mutaciones en el CH-CL cruzado (variante cargada): E123R y Q124K en el ligando dimérico de 4-1BB fusionado con CL humano, K147E y K213E en el ligando monomérico de 4-1BB fusionado con CH1 humano.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican una proteína de unión específica para CD19, clon 8B8-018 o clon 8B8-2B11, en fase con la cadena pesada constante del ojal o la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido 55 en la región constante de las cadenas pesadas del botón y el ojal para anular la unión a los receptores gamma de Fc de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico-botón Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión monomérica CH1, la cadena anti-CD19 dirigido-ojal Fc que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando trimérico de 4-1BB ensamblado y un Fab de 60 unión CD19 (**figuras 1A y 1B**). En consecuencia, se preparó una versión no dirigida al reemplazar la proteína de unión específica para CD19 por la estirpe germinal DP47 (**figura 1E**).

Tabla 1: Construcciones monovalentes usadas en los experimentos

	Ejemplo en el documento WO 2016/075278	compuesto de
mono-CD19(018)-4-1BBL (variante cargada)	Ejemplo 7.1.6 (construcción 3.4)	SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42
mono-CD19(2B11)-4-1BBL	Ejemplo 7.2.7 (construcción 4.5)	SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44
mono-DP47-4-1BBL no dirigido	Ejemplo 7.3.12 (control D)	SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44

a) Moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB bivalente dirigido y no dirigido a CD19

- 5 Se subclonaron las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera de una proteína de unión específica para CD19, clón 8B8-018 o clón 8B8-2B11, en fase con la cadena pesada constante del ojal, el botón o la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se introdujeron las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala en la región constante de las cadenas pesadas de botón y ojal para anular la unión a los receptores gamma Fc de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2012/130831. Además, se fusionó un polipéptido que comprende dos ectodominios del ligando de 4-1BB con el extremo C de la cadena de ojal Fc de IgG1 humana y se fusionó un polipéptido que comprende un ectodominio del ligando de 4-1BB con el extremo C de la cadena de botón Fc de IgG1 humana. La combinación de la cadena pesada del ligando dimérico del ojal anti-CD19 hulgG1 que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena pesada del ligando monomérico del botón anti-CD19 hulgG1 que contiene las mutaciones S354C/T366W y las cadenas ligeras anti-CD19 permitió la generación de un heterodímero, que incluía un ligando de 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fab de unión a CD19 (**figura 1C**). En consecuencia, se preparó una versión no dirigida al reemplazar la proteína de unión específica para CD19 por la estirpe germinal DP47 (**figura 1F**).

Tabla 2: Construcciones bivalentes usadas en los experimentos

	Ejemplo en el documento WO 2016/075278	compuesto de
bi-CD19(018)-4-1BBL	Ejemplo 7.1.8 (construcción 3.6)	2 x SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46
bi-CD19(2B11)-4-1BBL	Ejemplo 7.2.8 (construcción 4.6)	2 x SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52
bi-DP47-4-1BBL no dirigido	Ejemplo 7.3.12 (control C)	2 x SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75

La producción y caracterización de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigido y no dirigido a CD19 se describen en detalle en el documento WO 2016/075278, ejemplo 7.4 y ejemplos 8 a 11, respectivamente.

25 Ejemplo 2

Preparación, purificación y caracterización de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB)

30 Las moléculas de TCB se han preparado de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento WO 2016/020309 A1.

35 El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 (TCB CD20 CD3 o TCB CD20) usado en los experimentos corresponde a la molécula B como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 2016/020309 A1. La molécula B es un anticuerpo "2+1 IgG CrossFab" y se compone de dos cadenas pesadas diferentes y dos cadenas ligeras diferentes. Se introdujeron mutaciones puntuales en el dominio CH3 ("botones en ojales") para promover el ensamblaje de las dos cadenas pesadas diferentes. El intercambio de los dominios VH y VL en el Fab de unión a CD3 y las mutaciones puntuales en los dominios CH y CL en el Fab de unión a CD20 se realizaron para promover el ensamblaje correcto de las dos cadenas ligeras diferentes. 2+1 significa que la molécula tiene dos dominios de unión a antígeno específicos para CD20 y un dominio de unión a antígeno específico para CD3.

40 TCB CD20 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79. En la **figura 1D** se muestra un esquema esquemático del anticuerpo biespecífico en formato 2+1.

45 La molécula se caracteriza además en el ejemplo 1 del documento WO 2016/020309 A1.

Ejemplo 3**Propiedades de las moléculas de unión a antígeno CD19-4-1BBL (construcciones)****a) CD19-4-1BBL se une a CD19**

- 5 La capacidad de CD19-4-1BBL para unirse a CD19 se midió en linfocitos B humanos principales o en líneas de células tumorales positivas para CD19 (células WSU-DLCL2, DSMZ n.º ACC 575). En resumen, se purificaron leucocitos monomorfonucleares en sangre periférica (PBMC) frescos a partir de capas leucocíticas de donantes sanos. Las células se volvieron a suspender en DPBS (Gibco por Life Technologies, n.º de cat. 14190 326) y se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de células de suspensión de fondo redondo (greiner bio-one, cellstar, n.º de cat. 650185). Las células se lavaron una vez con 200 µl de DPBS. Las células se volvieron a suspender en 100 µl/pocillo de tampón DPBS frío a 4 °C que contenía tinte de viabilidad fijable eFluor 660 diluido al 1:5000 (eBioscience, n.º de cat. 65-0864-18) y las placas se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron una vez con 200 µl/pocillo de tampón DPBS frío a 4 °C y se volvieron a suspender en 50 µl/pocillo de tampón FACS frío a 4 °C (DPBS suministrado con FBS al 2 %, EDTA 5 mM pH8 (Amresco, n.º de cat. E177) y acida sódica 7,5 mM (Sigma-Aldrich S2002)) que contienen construcciones (mono-CD19(018)-4-1BBL, bi-CD19(018)-4-1BBL, mono-CD19(2B11)-4-1BBL, mono-4-1BBL no dirigido y/o bi-4-1BBL no dirigido) a una serie de concentraciones, seguido de incubación durante 1 hora a 4 °C.
- 10 20 Después de un lavado extenso, las células se tiñeron adicionalmente con 50 µl/pocillo de tampón FACS frío a 4 °C que contenía 5 µg/ml de fragmento F(ab')₂ de cabra específico de fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana de AffiniPure conjugado con PE (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109 116 098) y con un anticuerpo anti-CD20 conjugado con CPA-H7 (BD, n.º de cat. 560734), y un anticuerpo anti-CD3 conjugado con CPA (Biolegend, n.º de cat. 300312), y/o un anticuerpo anti-CD19 conjugado con FITC (BD) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 200 µl/pocillo a 4 °C de tampón FACS y las células se fijaron en 50 µl/pocillo de DPBS que contenía formaldehído al 1 % (Sigma, HT501320-9.5L). Las células se volvieron a suspender en 100 µl/pocillo de tampón FACS y se adquirieron usando el FACS LSR II (BD Biosciences). Los datos se analizaron usando FlowJo V10 (FlowJo, LLC) y GraphPad Prism 6.04 (GraphPad Software, Inc.).
- 15 30 35 Las células se seleccionaron en poblaciones vivas CD3-CD20⁺, y se trazaron medios geográficos de intensidad de fluorescencia del fragmento F(ab')₂ de IgG de cabra específico de fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana de AffiniPure conjugado con PE frente a la concentración titulada de construcciones. Como se muestra en la **figura 2A**, CD19-4-1BBL se une a linfocitos B humanos de una manera dependiente de la dosis, mientras que 4-1BBL no dirigido no se une a linfocitos B en PBMC humanos. La **figura 2B** muestra cómo la expresión de CD19 en los linfocitos B disminuye después de la unión de CD19-4-1BBL, lo que indica que CD19-4-1BBL se une a CD19 específicamente. De forma similar, las construcciones CD19-4-1BBL se unen a las células tumorales WSU CD19⁺, y la afinidad de unión es mucho mayor en las construcciones monovalentes que en las bivalentes (**figura 2C**).

b) CD19-4-1BBL se une a 4-1BB en linfocitos T activados

- 40 45 50 55 60 Para comprobar la unión de 4-1BBL a linfocitos T que expresan 4-1BB, se preactivaron PBMC humanos mediante estimulación con RLT para la regulación por incremento de 4-1BB en linfocitos T durante 48 horas. Los PBMC purificados se diluyeron a una concentración de 2,8 x 10⁶/ml y se volvieron a suspender en medio RPMI (Gibco, n.º de cat. 72400-054) + FBS al 10 % (Gibco, n.º de cat. 20012-068) y penicilina-estreptomicina al 1 % (Gibco, n.º de cat. 15070-063) y 2-mercaptoetanol 50 µM (Gibco, n.º de cat. 31350-010). Se añadieron 90 µl de células a cada pocillo de placas de 96 pocillos de fondo redondo (greiner bio-one, cellstar, n.º de cat. 650185). A continuación, se añadieron a los pocillos 50 µl adicionales de microesferas anti-CD3 y anti-CD28 (Life Technologies, n.º de cat. 11131D) a 8 x 10⁵ microesferas/ml. Dos días después, las células se lavaron una vez con PBS frío (Gibco, 20012-068) y se volvieron a suspender con 90 µl de PBS frío y se incubaron con 10 µl de soluciones que contenían construcciones (CD19(018)-4-1BBL monovalente, CD19(018)-4-1BBL bivalente y 4-1BBL monovalente no dirigido) durante 1 hora a 4 °C. Después de un lavado extenso, las células se tiñeron adicionalmente con 50 µl/pocillo de tampón FACS frío que contenía 5 µg/ml de fragmento F(ab')₂ de cabra específico de fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana de AffiniPure conjugado con PE (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109116 098), y adicionalmente con anticuerpo anti-CD3 humano (Biolegend, n.º de cat. 300312), anti-CD4 humano (Biolegend, n.º de cat. 317434) y anti-CD8 humano (Biolegend, n.º de cat. 344710) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 200 µl/pocillo de tampón FACS a 4 °C y las células se fijaron en 50 µl/pocillo de DPBS que contenía formaldehído al 1 % (Sigma, HT501320-9.5L). Las células se volvieron a suspender en 100 µl/pocillo de tampón FACS y se adquirieron usando el FACS LSR II (BD Biosciences). Los datos se analizaron usando FlowJo V10 (FlowJo, LLC) y GraphPad Prism 6.04 (GraphPad Software, Inc.).
- La unión específica se seleccionó en la población pura de células CD4 y CD8 activadas. Todas las construcciones mostraron propiedades de unión similares a linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ que expresan 4-1BB de una manera dependiente de la dosis (**figuras 3A y 3B**).

c) CD19-4-1BBL muestra actividad biológica

Para medir las actividades biológicas en entornos fisiológicos, se usan PBMC humanos activados para comprobar la liberación de la molécula de función efectora IFN-γ mediante la coestimulación de linfocitos T y linfocitos NK. En resumen, se añadieron PBMC purificados cocultivados con construcciones (CD19(018)-4-1BBL monovalente, CD19(018)-4-1BBL bivalente, CD19(2B11)-4-1BBL monovalente y 4-1BBL monovalente no dirigido) a los pocillos a una serie de concentraciones, y 50 µl de microesferas anti-CD3 y anti-CD28 (Life Technologies, n.º de cat. 11131D) a 8 x 10⁵ microesferas/ml. Después de 48 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes para la medición de IFN-γ mediante ELISA (kit ELISA de IFN-γ humano DuoSet, R&D Systems, n.º de cat. DY285). La **figura 4** muestra que tanto las construcciones monovalentes como las bivalentes estimulan los PBMC para producir una cantidad similar de IFN-γ, mientras que las construcciones de 4-1BBL no dirigido negativo no activaron los linfocitos T ni los linfocitos NK debido a la falta de reticulación.

Ejemplo 4**15 Mecanismos de politerapia de CD19-4-1BBL y TCB CD20 *in vitro*****a) TCB CD20 media la redistribución de CD19-4-1BBL en linfocitos T**

20 La hipótesis para la politerapia de CD19-4-1BBL y TCB CD20 se basó en la suposición de que TCB CD20 desencadenaría la activación inicial de los linfocitos T a través de la unión del antígeno tumoral CD20, lo que daría lugar a la regulación por incremento de 4-1BB en los linfocitos T activados, permitiendo por lo tanto que CD19-4-1BBL coestimule 4-1BB y de ese modo refuerce la función efectora de los linfocitos T. Para comprender y confirmar dichos modos de acción de esta politerapia, se aprovechó la microscopía confocal de lapso de tiempo para monitorizar la formación de sinapsis inmunológicas en los linfocitos T activados. Las células WSU-DLCL2 se tiñeron con colorante Blue CMAC (Molecular Probes, Life Technologies) y se colocaron durante la noche en una placa de cultivo "ibiTreat" de 8 pocillos (*ibid*) a 37 °C para que se adhirieran. Las células se lavaron después de 24 horas y se volvieron a suspender con medio antes de añadir linfocitos T CD8 positivos activados, teñidos con CMFDA (Molecular Probes, Life Technologies). Se añadió adicionalmente CD19-41BBL marcado con Alexa F647 (10 µg/ml) y TCB CD20 CD3 (5 ng/ml o 500 ng/ml) directamente en el medio de crecimiento. A continuación, los portaobjetos de imágenes se transfirieron al microscopio confocal (LSM 700 invertido, Zeiss) con una fase de temperatura y CO₂ controlados y se permitió que la temperatura se equilibrara durante 15 minutos dentro de la incubadora del microscopio antes de la adquisición *in vivo* con un objetivo de aceite de 60 aumentos. Las películas se recogieron mediante el programa informático Zen (Zeiss) acoplado al microscopio, mientras que el análisis de la intensidad de CD19-41BBL en el sitio de interacción se realizó con Imaris (Bitplane; Oxford Instruments). La cuantificación se realizó mediante el algoritmo IMARIS de área de contacto superficie-superficie. El algoritmo crea un objeto de superficie de un vóxel de espesor sobre la superficie principal (célula tumoral) en el área cubierta por la superficie secundaria (linfocito T). A continuación, se mide la intensidad total de la señal de CD19-41BBL dentro de la superficie de contacto resultante y se cuantifica a lo largo del tiempo.

40 La **figura 5A** muestra la localización dinámica de CD19-41BBL durante la reticulación de linfocitos T y células tumorales mediada por TCB CD20 CD3, que se concentró en los sitios de interacción de una manera dependiente de la dosis de TCB CD20 CD3. La interacción se inicia primero por la reticulación de TCB CD20 CD3, seguida de la redistribución de CD19-41BBL a la sinapsis inmunológica posiblemente mediada por balsas lipídicas atraídas por la unión a CD20 (la proteína de unión se origina en el anticuerpo de tipo II, obinutuzumab). La polarización de CD19-41BBL en la sinapsis de linfocitos T y células tumorales sugiere un posible modo de acción combinatorio por el cual un umbral de concentración de TCB CD20 CD3 (**figura 5B**) puede localizar y mantener señales coestimuladoras de 41BB, que sinergizan con las señales tempranas de activación de CD3. Este sinergismo podría desencadenar las señales en cascada de 41BB para prevenir la muerte celular inducida por la activación de los linfocitos T, lo que da como resultado una población de linfocitos T más robusta en el microambiente tumoral, como se observa mediante el análisis histológico en el experimento de eficacia *in vivo*.

b) CD19-4-1BBL no es internalizado por CD19 en linfocitos B

55 La localización subcelular de la molécula de CD19-4-1BBL es un parámetro crítico por su funcionalidad y por su sinergia con el anticuerpo biespecífico TCB CD20. No solo la molécula de CD19-4-1BBL debe dirigirse a las células tumorales que expresan CD19, sino que no se debe internalizar, ya que el agonismo de 4-1BB a través de 4-1BBL necesita reticulación de anticuerpos en CD19. Se ha informado de que muchos anticuerpos anti-CD19 se pueden internalizar rápidamente por linfocitos B, incluyendo las células del linfoma no Hodgkin (LNH) (Ingle *et al.*, 2008). Por lo tanto, se sometieron a prueba construcciones mediante microscopio confocal para ver si se pueden internalizar por las células WSU DLCL2 de la línea celular del LNH. Para hacerlo, las construcciones de CD19-4-1BBL se marcaron primero con Alexa-647 antes de la incubación con células WSU a 37 °C y, a continuación, se fijó la interacción en diferentes puntos temporales (a los 15 minutos, 1 y 3 horas) y se evaluó la localización (intracelular o localizada en la membrana) de CD19-4-1BBL mediante microscopía confocal. Al observar el apilamiento Z central de la imagen, es posible observar que la molécula CD19-4-1BBL-Alexa-647 se localiza principalmente en la membrana durante las 3 horas (**figura 6**). Por el contrario, el control positivo de un anticuerpo anti-CD19 (clon Bu12) se internaliza rápidamente, reduciendo su exposición en la superficie de las células tumorales.

Ejemplo 5**Potente efecto antitumoral mediante politerapia de CD19-4-1BBL y TCB CD20 *in vivo*****a) SDPK de construcciones de CD19-4-1BBL en ratones NOD/Shi-scid/IL-2Rynull (NOG) inmunodeficientes**

Antes de los estudios de eficacia *in vivo*, primero se realizó un estudio de farmacodinámica de dosis única (SDPK). Ratones NOD/Shi-scid/IL-2Rynull (NOG) hembra de 6-7 semanas de edad al inicio del experimento (criados en Taconic, Dinamarca) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz y 12 h de oscuridad de acuerdo con las directrices acordadas (GV-Solas, Felasa, TierschG). Las autoridades gubernamentales locales revisaron y aprobaron el protocolo del estudio experimental (ZH193/2014). Después de su llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento de salud continuo de manera regular.

A los ratones se les inyectó por vía intravenosa 50 µg/ratón (2,5 mg/kg) de las tres construcciones de 4-1-BBL diferentes (véanse las composiciones en la tabla 3), mientras que se extrajo sangre de 3 ratones por grupo y punto temporal. Todos los ratones recibieron una inyección con un volumen total de 200 µl de la solución apropiada. Para obtener la cantidad apropiada de construcciones por 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con PBS cuando fue necesario. Se recogieron muestras de suero 10 min, 1 h, 3 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h y 168 h después de la inyección de tratamiento. Como se ve en la **figura 7**, todas las moléculas revelan un perfil PK estable y similar a IgG.

Tabla 3: Composiciones usadas en los experimentos *in vivo*

Compuesto	Dosis	Támpón de formulación	Concentración (mg/ml)
mono-CD19(018)-4-1BBL	2,5 mg/kg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	5,40 (= solución madre)
bi-CD19(018)-4-1BBL	2,5 mg/kg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	3,78 (= solución madre)
mono-CD19(2B11)-4-1BBL	2,5 mg/kg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	4,61 (= solución madre)

b) Actividad antitumoral superior de la construcción de CD19-4-1BBL monovalente en combinación con TCB CD20 en comparación con la construcción bivalente

La primera prueba de concepto para la combinación de TCB CD20 y CD19-4-1BBL tenía como objetivo seleccionar el mejor formato (unión monovalente frente a bivalente para CD19, clon 018) de las construcciones de CD19-4-1BBL en términos de regresión tumoral en ratones NOG completamente humanizados.

Las células WSU-DLCL2 (linfoma difuso humano de linfocitos B grandes) se obtuvieron originalmente de la ECACC (European Collection of Cell Culture) y después de la expansión se depositaron en el banco de células interno de Roche-Glycart. Se cultivaron las células en RPMI que contenía FCS al 10 % y 1x Glutamax. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO₂ al 5 %. Se inyectaron por vía subcutánea 1,5 x 10⁶ células (paso 18 *in vitro*) por animal en el flanco derecho de los animales en medio de cultivo celular RPMI (Gibco) y matriz GFR (1:1, volumen total de 100 µl) a una viabilidad >95,0 %.

Ratones hembra NOD/Shi-scid/IL-2Rynull (NOG) de 4-5 semanas de edad al inicio del experimento (criados en Taconic, Dinamarca) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las directrices acordadas (GV-Solas, Felasa, TierschG). Las autoridades gubernamentales locales revisaron y aprobaron el protocolo del estudio experimental (P 2011/128). Después de su llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento de salud continuo de manera regular.

De acuerdo con el protocolo (**figura 8**), a los ratones NOG hembra se les inyectaron por vía intraperitoneal 15 mg/kg de busulfano seguido un día después de una inyección por vía intravenosa de 1 x 10⁵ células madre hematopoyéticas humanas aisladas de sangre del cordón umbilical. En la semana 14-16 después de la inyección de células madre, se extrajo sangre sublingual a los ratones y se analizó la sangre mediante citometría de flujo para confirmar la humanización exitosa. Los ratones injertados de manera eficiente se asignaron de forma aleatoria de acuerdo con sus frecuencias de linfocitos T humanos a los diferentes grupos de tratamiento (**figura 8**, n = 10/grupo). En ese momento, a los ratones se les inyectaron células tumorales por vía subcutánea como se describe anteriormente y se trataron una vez a la semana con los compuestos o PBS (vehículo) cuando el tamaño del tumor alcanzó aprox. 450 mm³. Los ratones recibieron una inyección i.v. de 200 µl de la solución apropiada. Para obtener la cantidad apropiada de compuestos por 200 µl, las soluciones madre (tabla 4) se diluyeron con PBS

cuando fue necesario.

Tabla 4: Composiciones usadas en este experimento

Compuesto	Tampón de formulación	Concentración (mg/ml)
mono-CD19(018)-4-1BBL	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	5,12 (= solución madre)
bi-CD19(018)-4-1BBL	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	3,32 (= solución madre)
mono-4-1BBL no dirig.	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	1,06 (= solución madre)
TCB CD20	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	4,12 (= solución madre)

5

Para las politerapias (grupos de animales E a I, véase la tabla en la figura 8) con TCB CD20, las construcciones de CD19-4-1BBL se inyectaron de manera concomitante. El crecimiento tumoral se midió dos veces por semana usando un calibrador y el volumen tumoral se calculó como sigue:

10 $T_v: (W^2/2) \times L$ (*W: anchura, L: longitud*)

15 El estudio finalizó y todos los ratones se sacrificaron después de cuatro inyecciones de los compuestos (día 37 después de la inyección de células tumorales) y los tumores se explantaron y pesaron. La **figura 9A** muestra la cinética de crecimiento tumoral (mediana) en todos los grupos de tratamiento, así como los pesos tumorales al final del estudio. Tanto las monoterapias de mono-CD19(018)-4-1BBL como de bi-CD19(018)-4-1BBL no revelaron ninguna inhibición del crecimiento tumoral, mientras que TCB CD20 como agente único indujo una fuerte inhibición del crecimiento tumoral. Sin embargo, la combinación de mono-CD19(018)-4-1BBL con TCB CD20 no solo indujo una inhibición del crecimiento tumoral más fuerte y más rápida en comparación con la monoterapia de TCB CD20, sino que también fue superior a la combinación de CD19(018)-4-1BBL bivalente o 4-1BBL monovalente no dirigido y TCB CD20 en todas las dosis sometidas a prueba. Como también se muestra en la **figura 9b**, los pesos tumorales al final del estudio confirmaron estos hallazgos; sin embargo, se observan diferencias notables en términos de inhibición del crecimiento tumoral en la cinética del crecimiento tumoral, especialmente en puntos temporales anteriores (**figura 9A**). Estos datos sugieren que la unión monovalente a CD19 (mono-CD19(018)-4-1BBL) es superior en términos de inhibición del crecimiento tumoral cuando se combina con TCB CD20.

25

c) Las combinaciones de CD19-4-1BBL y TCB CD20 se sinergizan para inducir la infiltración masiva de linfocitos T en el tumor

30 Para comprender los modos de acción de la combinación de CD19-4-1BBL y TCB CD20, se realizó un nuevo estudio para estudiar la farmacodinámica de la respuesta inmunitaria en estos ratones. El experimento se diseñó de manera similar a la descrita en el estudio anterior (**figura 10**). Se han incluido dos clones de proteínas de unión específicas para CD19 en este estudio (clon 018 frente al clon 2B11) (tabla 5).

Tabla 5: Composiciones usadas en este experimento

35

Compuesto	Tampón de formulación	Concentración (mg/ml)
mono-CD19(018)-4-1BBL	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	5,12 (= solución madre)
mono-CD19(2B11)-4-1BBL	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	4,61 (= solución madre)
TCB CD20	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	4,12 (= solución madre)

40

La **figura 11A** muestra la cinética de crecimiento tumoral (mediana) en todos los grupos de tratamiento, así como los pesos tumorales al final del estudio. Como se muestra en el estudio anterior (**figura 9A**), TCB CD20 como agente único indujo una fuerte inhibición del crecimiento tumoral. La combinación de mono-CD19(018)-4-1BBL o de mono-CD19(2B11)-4-1BBL con TCB CD20 indujeron una inhibición potenciada y más rápida del crecimiento tumoral en comparación con la monoterapia de TCB CD20. Sin embargo, ambas moléculas son comparables en el refuerzo de la inhibición del crecimiento tumoral mediada por TCB CD20. Como se muestra también en la **figura 11B**, los pesos tumorales al final del estudio confirmaron estos hallazgos.

45

El análisis de los tumores de los animales sacrificados el día 20 del estudio reveló una infiltración intratumoral potenciada de linfocitos T humanos (**figura 12A**) y un cambio de las relaciones CD8/CD4 y CD8/Treg hacia las células CD8 en ambos grupos de combinación en comparación con TCB CD20 solo o con el tratamiento con

vehículo (**figuras 12B y 12C**). Por lo tanto, se confirma una nueva politerapia mediante la cual CD19-4-1BBL y TCB CD20 se sinergizan para erradicar los tumores al potenciar los linfocitos T en los tumores.

Referencias:

- Bartkowiak, T. y Curran, M. A. (2015). 4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity. *Front Oncol* 5, 117.
- Diehl, L., van Mierlo, G. J., den Boer, A. T., van der Voort, E., Fransen, M., van Bostelen, L., Krimpenfort, P., Melief, C. J., Mittler, R., Toes, R. E. y Offringa, R. (2002). In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28 costimulatory pathway. *J Immunol* 168, 3755-3762.
- Dubrot, J., Milheiro, F., Alfaro, C., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Perez-Gracia, J. L., Morales-Kastresana, A., Romero-Trevejo, J. L., Ochoa, M. C., Hervas-Stubbs, S. et al. (2010). Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ. *Cancer Immunol Immunother* 59, 1223-1233.
- Goodwin, R. G., Din, W. S., Davis-Smith, T., Anderson, D. M., Gimpel, S. D., Sato, T. A., Maliszewski, C. R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. et al. (1993). Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 23, 2631-2641.
- Hornig, N., Kermer, V., Frey, K., Diebold, P., Kontermann, R. E. y Muller, D. (2012). Combination of a bispecific antibody and costimulatory antibody-ligand fusion proteins for targeted cancer immunotherapy. *J Immunother* 35, 418-429.
- Ingle, G. S., Chan, P., Elliott, J. M., Chang, W. S., Koeppen, H., Stephan, J. P. y Scales, S. J. (2008). High CD21 expression inhibits internalization of anti-CD 19 antibodies and cytotoxicity of an anti-CD 19-drug conjugate. *Br J Haematol* 140, 46-58.
- Kwon, B. S. y Weissman, S. M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1963-1967.
- Li, F. y Ravetch, J. V. (2011). Inhibitory Fcgamma receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. *Science* 333, 1030-1034.
- Melero, I., Shuford, W. W., Newby, S. A., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Hellstrom, K. E., Mittler, R. S. y Chen, L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 3, 682-685.
- Muller, D., Frey, K. y Kontermann, R. E. (2008). A novel antibody-4-1BBL fusion protein for targeted costimulation in cancer immunotherapy. *J Immunother* 31, 714-722.
- Shao, Z. y Schwarz, H. (2011). CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. *J Leukoc Biol* 89, 21-29.
- Simeone, E. y Ascierto, P. A. (2012). Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD 137, and anti-PD1. *J Immunotoxicol* 9, 241-247.
- Snell, L. M., Lin, G. H., McPherson, A. J., Moraes, T. J. y Watts, T. H. (2011). T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 244, 197-217.
- Vinay, D. S. y Kwon, B. S. (2011). 4-1BB signaling beyond T cells. *Cell Mol Immunol* 8, 281-284.
- Zhang, N., Sadun, R. E., Arias, R. S., Flanagan, M. L., Sachsman, S. M., Nien, Y. C., Khawli, L. A., Hu, P. y Epstein, A. L. (2007). Targeted and untargeted CD137L fusion proteins for the immunotherapy of experimental solid tumors. *Clin Cancer Res* 13, 2758-2767.
- Zhang, X., Voskens, C. J., Sallin, M., Maniar, A., Montes, C. L., Zhang, Y., Lin, W., Li, G., Burch, E., Tan, M. et al. (2010). CD137 promotes proliferation and survival of human B cells. *J Immunol* 184, 787-795.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Politerapia de anticuerpos biespecíficos anti-CD20/anti-CD3 y agonistas de 4-1BB (CD137)

<130> P33995-WO

<150> EP16205493.6

<151> 20/12/2016

<160> 115

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg	Glu	Gly	Pro	Glu	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Asp
1				5				10						15	

Leu	Arg	Gln	Gly	Met	Phe	Ala	Gln	Leu	Val	Ala	Gln	Asn	Val	Leu	Leu
	20					25					30				

Ile	Asp	Gly	Pro	Leu	Ser	Trp	Tyr	Ser	Asp	Pro	Gly	Leu	Ala	Gly	Val
	35				40					45					

Ser	Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Ser	Tyr	Lys	Glu	Asp	Thr	Lys	Glu	Leu	Val
	50				55			60							

Val	Ala	Lys	Ala	Gly	Val	Tyr	Tyr	Val	Phe	Phe	Gln	Leu	Glu	Leu	Arg
65					70				75				80		

Arg	Val	Val	Ala	Gly	Glu	Gly	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Leu	Ala	Leu	His
	85						90					95			

Leu	Gln	Pro	Leu	Arg	Ser	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu	Thr
	100					105					110			

Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Ala	Ser	Ser	Glu	Ala	Arg	Asn	Ser	Ala	Phe	Gly
	115					120				125					

Phe	Gln	Gly	Arg	Leu	Leu	His	Leu	Ser	Ala	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Val
	130					135				140					

His	Leu	His	Thr	Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	His	Ala	Trp	Gln	Leu	Thr	Gln
145					150				155			160			

ES 2 847 973 T3

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
180

<210> 2
<211> 170
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
1 5 10 15

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
20 25 30

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
35 40 45

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
50 55 60

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
65 70 75 80

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
85 90 95

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
100 105 110

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
115 120 125

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
130 135 140

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
145 150 155 160

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
165 170

<210> 3
<211> 175
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 847 973 T3

<400> 3

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
20 25 30

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
50 55 60

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
65 70 75 80

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
115 120 125

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
130 135 140

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
145 150 155 160

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
165 170 175

<210> 4
<211> 203
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn

ES 2 847 973 T3

35

40

45

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95

Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
130 135 140

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
145 150 155 160

Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
165 170 175

Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
180 185 190

Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
195 200

<210> 5
<211> 178
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 847 973 T3

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val

50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu

<210> 6
<211> 164
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 847 973 T3

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
1 5 10 15

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
20 25 30

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
35 40 45

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
50 55 60

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
65 70 75 80

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Leu Ala
85 90 95

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
100 105 110

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
115 120 125

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
130 135 140

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
145 150 155 160

Pro Ala Gly Leu

<210> 7
<211> 169
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 847 973 T3

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
20 25 30

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
50 55 60

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
65 70 75 80

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
115 120 125

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
130 135 140

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
145 150 155 160

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
165

<210> 8
<211> 197
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 847 973 T3

Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
35 40 45

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95

Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
130 135 140

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
145 150 155 160

Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
165 170 175

Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
180 185 190

Ile Pro Ala Gly Leu
195

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD19(8B8-018) CDR-H1

<400> 9

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD19(8B8-018) CDR-H2

<400> 10

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD19(8B8-018) CDR-H3

<400> 11

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD19(8B8-018) CDR-L1

<400> 12

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD19(8B8-018) CDR-L2

<400> 13

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 847 973 T3

<220>
<223> CD19(8B8-018) CDR-L3

<400> 14

Leu Gln Leu Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD19(8B8-2B11) CDR-H1

<400> 15

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD19(8B8-2B11) CDR-H2

<400> 16

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD19(8B8-2B11) CDR-H3

<400> 17

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD19(8B8-2B11) CDR-L1

<400> 18

ES 2 847 973 T3

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Thr Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RVSKRFS

<400> 19

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

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

<220>
<223> CD19(8B8-2B11) CDR-L3

<400> 20

Leu Gln Leu Leu Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 21
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD19(8B8-018) VH

<400> 21

ES 2 847 973 T3

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CD19(8B8-018) VL

<400> 22

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro
20 25 30

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

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

ES 2 847 973 T3

65

70

75

80

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

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

<210> 23
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD19(8B8-2B11) VH

<400> 23

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD19(8B8-2B11) VL

<400> 24

ES 2 847 973 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

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

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

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

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

Leu Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 25

<211> 378

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 4-1BBL hu (71-254) dimérico conectado mediante conector (G4S)2

<400> 25

ES 2 847 973 T3

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

ES 2 847 973 T3

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
305 310 315 320

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
325 330 335

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
340 345 350

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
355 360 365

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
370 375

<210> 26
<211> 350
<212> PRT

ES 2 847 973 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 4-1BBL hu (85-254) dimérico conectado mediante conector (G4S)2

<400> 26

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
1 5 10 15

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
20 25 30

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
35 40 45

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
50 55 60

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
65 70 75 80

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
85 90 95

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
100 105 110

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
115 120 125

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
130 135 140

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
145 150 155 160

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Ser Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val

ES 2 847 973 T3

180

185

190

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
195 200 205

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
210 215 220

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
225 230 235 240

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
245 250 255

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
260 265 270

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
275 280 285

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
290 295 300

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
305 310 315 320

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
325 330 335

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
340 345 350

<210> 27
<211> 360
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu (80-254) dimérico conectado mediante conector (G4S)2

<400> 27

ES 2 847 973 T3

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
20 25 30

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
50 55 60

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
65 70 75 80

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
115 120 125

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
130 135 140

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
145 150 155 160

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
180 185 190

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
195 200 205

ES 2 847 973 T3

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
210 215 220

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
225 230 235 240

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
245 250 255

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
260 265 270

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Leu Ala Leu Thr
275 280 285

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
290 295 300

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
305 310 315 320

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
325 330 335

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
340 345 350

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
355 360

<210> 28

<211> 416

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 4-1BBL hu (52-254) dimérico conectado mediante conector (G4S)2

<400> 28

Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
35 40 45

ES 2 847 973 T3

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95

Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
130 135 140

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
145 150 155 160

Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
165 170 175

Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
180 185 190

Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser
195 200 205

Gly Gly Gly Ser Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro
210 215 220

Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
225 230 235 240

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
245 250 255

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
260 265 270

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
275 280 285

ES 2 847 973 T3

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
290 295 300

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
305 310 315 320

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
325 330 335

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
340 345 350

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
355 360 365

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
370 375 380

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
385 390 395 400

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
405 410 415

<210> 29
<211> 366
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu (71-248) dimérico conectado mediante conector (G4S)2

<400> 29

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

ES 2 847 973 T3

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
180 185 190

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
195 200 205

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
210 215 220

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
225 230 235 240

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
245 250 255

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
260 265 270

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
275 280 285

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
290 295 300

ES 2 847 973 T3

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
305 310 315 320

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
325 330 335

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
340 345 350

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
355 360 365

<210> 30

<211> 338

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 4-1BBL hu (85-248) dimérico conectado mediante conector (G4S)2

<400> 30

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
1 5 10 15

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
20 25 30

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
35 40 45

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
50 55 60

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
65 70 75 80

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
85 90 95

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
100 105 110

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
115 120 125

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
130 135 140

ES 2 847 973 T3

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
145 150 155 160

Pro Ala Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Asp
165 170 175

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
180 185 190

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
195 200 205

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
210 215 220

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
225 230 235 240

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
245 250 255

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
260 265 270

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
275 280 285

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
290 295 300

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
305 310 315 320

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
325 330 335

Gly Leu

<210> 31

<211> 348

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 4-1BBL hu (80-248) dimérico conectado mediante conector (G4S)2

<400> 31

ES 2 847 973 T3

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
20 25 30

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
50 55 60

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
65 70 75 80

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
115 120 125

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
130 135 140

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
145 150 155 160

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly
165 170 175

Gly Gly Ser Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe
180 185 190

Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser
195 200 205

Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu
210 215 220

Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val
225 230 235 240

ES 2 847 973 T3

Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser
260 265 270

Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala
275 280 285

Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu
290 295 300

His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala
305 310 315 320

Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly
325 330 335

Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
340 345

<210> 32

<211> 404

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 4-1BBL hu (52-248) dimérico conectado mediante conector (G4S)2

<400> 32

Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
35 40 45

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95

ES 2 847 973 T3

Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
130 135 140

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
145 150 155 160

Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
165 170 175

Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
180 185 190

Ile Pro Ala Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Pro
195 200 205

Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro
210 215 220

Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
225 230 235 240

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
245 250 255

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
260 265 270

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
275 280 285

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
290 295 300

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
305 310 315 320

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
325 330 335

ES 2 847 973 T3

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
340 345 350

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
355 360 365

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
370 375 380

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
385 390 395 400

Pro Ala Gly Leu

<210> 33
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)

<400> 33

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

ES 2 847 973 T3

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

ES 2 847 973 T3

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 34
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera anti-CD19(8B8-018)

<400> 34

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro
20 25 30

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

ES 2 847 973 T3

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

Asp Arg Phe 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 Leu Gln Leu
85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 35

<211> 722

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena de botón Fc de 4-1BBL hu (71-254)-CL* dimérico

<400> 35

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

ES 2 847 973 T3

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val

35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

ES 2 847 973 T3

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
305 310 315 320

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
325 330 335

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
340 345 350

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
355 360 365

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
385 390 395 400

Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
405 410 415

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
420 425 430

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
435 440 445

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
450 455 460

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
465 470 475 480

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp
485 490 495

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
500 505 510

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 515 520 525

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 530 535 540

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 545 550 555 560

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 565 570 575

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 580 585 590

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 595 600 605

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 610 615 620

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 625 630 635 640

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 645 650 655

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 660 665 670

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 675 680 685

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 690 695 700

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 705 710 715 720

Gly Lys

<210> 36
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 4-1BBL hu (71-254)-CH1* monomérico

ES 2 847 973 T3

<400> 36

Arg	Glu	Gly	Pro	Glu	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Asp
1				5				10							15
Leu	Arg	Gln	Gly	Met	Phe	Ala	Gln	Leu	Val	Ala	Gln	Asn	Val	Leu	Leu
				20				25							30
Ile	Asp	Gly	Pro	Leu	Ser	Trp	Tyr	Ser	Asp	Pro	Gly	Leu	Ala	Gly	Val
	35						40								45
Ser	Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Ser	Tyr	Lys	Glu	Asp	Thr	Lys	Glu	Leu	Val
	50						55								60
Val	Ala	Lys	Ala	Gly	Val	Tyr	Tyr	Val	Phe	Phe	Gln	Leu	Glu	Leu	Arg
	65						70				75				80
Arg	Val	Val	Ala	Gly	Glu	Gly	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Leu	Ala	Leu	His
					85				90						95
Leu	Gln	Pro	Leu	Arg	Ser	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu	Thr
					100				105						110
Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Ala	Ser	Ser	Glu	Ala	Arg	Asn	Ser	Ala	Phe	Gly
					115			120							125
Phe	Gln	Gly	Arg	Leu	Leu	His	Leu	Ser	Ala	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Val
					130			135							140
His	Leu	His	Thr	Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	His	Ala	Trp	Gln	Leu	Thr	Gln
					145			150				155			160
Gly	Ala	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Phe	Arg	Val	Thr	Pro	Glu	Ile	Pro	Ala
					165			170							175
Gly	Leu	Pro	Ser	Pro	Arg	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
					180			185							190
Gly	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser
					195			200				205			
Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu
					210			215				220			
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu
					225			230			235				240

ES 2 847 973 T3

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
245 250 255

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
260 265 270

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
275 280 285

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
290 295

<210> 37

<211> 722

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena de botón Fc de 4-1BBL hu (71-254)-CL dimérico

<400> 37

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

ES 2 847 973 T3

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
305 310 315 320

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
325 330 335

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
340 345 350

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
355 360 365

ES 2 847 973 T3

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
385 390 395 400

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
405 410 415

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
420 425 430

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
435 440 445

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
450 455 460

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
465 470 475 480

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp
485 490 495

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
500 505 510

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
515 520 525

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu
530 535 540

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
545 550 555 560

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
565 570 575

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
580 585 590

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
595 600 605

ES 2 847 973 T3

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
610 615 620

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
625 630 635 640

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
645 650 655

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
660 665 670

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
675 680 685

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
690 695 700

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
705 710 715 720

Gly Lys

<210> 38
<211> 297
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu (71-254)-CH1 monomérico

<400> 38

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

ES 2 847 973 T3

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
195 200 205

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
210 215 220

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
225 230 235 240

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
245 250 255

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
260 265 270

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
275 280 285

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
290 295

<210> 39

<211> 838

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 847 973 T3

<223> cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)

<400> 39

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

ES 2 847 973 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

ES 2 847 973 T3

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu
645 650 655

Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg
660 665 670

Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp
675 680 685

Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu
690 695 700

ES 2 847 973 T3

Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala
705 710 715 720

Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val
725 730 735

Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln
740 745 750

Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp
755 760 765

Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln
770 775 780

Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
785 790 795 800

His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
805 810 815

Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820 825 830

Pro Ser Pro Arg Ser Glu
835

<210> 40

<211> 644

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ligando monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-018)

<400> 40

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 Asp Tyr
20 25 30

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

ES 2 847 973 T3

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Ile Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

ES 2 847 973 T3

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
 515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
 530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
 545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
 565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
 580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
 595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
 610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
 625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu

<210> 41
 <211> 710
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena de botón Fc de 4-1BBL hu (71-248)-CL* dimérico

<400> 41

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
 20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
 35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
 50 55 60

ES 2 847 973 T3

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
180 185 190

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
195 200 205

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
210 215 220

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
225 230 235 240

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
245 250 255

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
260 265 270

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
275 280 285

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
290 295 300

ES 2 847 973 T3

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
305 310 315 320

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
325 330 335

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
340 345 350

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
370 375 380

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
385 390 395 400

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
405 410 415

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
420 425 430

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
435 440 445

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
450 455 460

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
465 470 475 480

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
485 490 495

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
500 505 510

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
515 520 525

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
530 535 540

ES 2 847 973 T3

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
545 550 555 560

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
565 570 575

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
580 585 590

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
595 600 605

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
610 615 620

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
625 630 635 640

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
645 650 655

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
660 665 670

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
675 680 685

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
690 695 700

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710

<210> 42
<211> 291
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu (71-248)-CH1* monomérico

<400> 42

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

ES 2 847 973 T3

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys
180 185 190

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
195 200 205

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
210 215 220

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
225 230 235 240

ES 2 847 973 T3

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
245 250 255

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
260 265 270

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro
275 280 285

Lys Ser Cys
290

<210> 43
<211> 710
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de botón Fc de 4-1BBL hu (71-248)-CL dimérico

<400> 43

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

ES 2 847 973 T3

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
180 185 190

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
195 200 205

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
210 215 220

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
225 230 235 240

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
245 250 255

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
260 265 270

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
275 280 285

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
290 295 300

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
305 310 315 320

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
325 330 335

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
340 345 350

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
370 375 380

ES 2 847 973 T3

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
385 390 395 400

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
405 410 415

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
420 425 430

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
435 440 445

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
450 455 460

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
465 470 475 480

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
485 490 495

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
500 505 510

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
515 520 525

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
530 535 540

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
545 550 555 560

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
565 570 575

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
580 585 590

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
595 600 605

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
610 615 620

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 625 630 635 640

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 645 650 655

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 660 665 670

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 675 680 685

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 690 695 700

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 705 710

<210> 44

<211> 291

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 4-1BBL hu (71-248)-CH1 monomérico

<400> 44

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
 20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
 35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
 50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
 65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
 85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Leu Ala Leu Thr
 100 105 110

ES 2 847 973 T3

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys
180 185 190

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
195 200 205

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
210 215 220

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
225 230 235 240

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
245 250 255

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
260 265 270

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
275 280 285

Lys Ser Cys
290

<210> 45

<211> 826

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena (71-248) de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)

<400> 45

ES 2 847 973 T3

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

ES 2 847 973 T3

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

ES 2 847 973 T3

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Gly Gly
625 630 635 640

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
645 650 655

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
660 665 670

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
675 680 685

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
690 695 700

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
705 710 715 720

ES 2 847 973 T3

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
725 730 735

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
740 745 750

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
755 760 765

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
770 775 780

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
785 790 795 800

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
805 810 815

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820 825

<210> 46

<211> 638

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ligando (71-248) monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-018)

<400> 46

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ES 2 847 973 T3

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

ES 2 847 973 T3

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

ES 2 847 973 T3

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
625 630 635

<210> 47
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)

<400> 47

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

ES 2 847 973 T3

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

ES 2 847 973 T3

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 48
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19(8B8-2B11)

<400> 48

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

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

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

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

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

ES 2 847 973 T3

Leu Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 49

<211> 838

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena (71-254) de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)

<400> 49

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ES 2 847 973 T3

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

ES 2 847 973 T3

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

ES 2 847 973 T3

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Glu
645 650 655

Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg
660 665 670

Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp
675 680 685

Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu
690 695 700

Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala
705 710 715 720

Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val
725 730 735

Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln
740 745 750

Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp
755 760 765

Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln
770 775 780

Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
785 790 795 800

His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
805 810 815

Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
 820 825 830

Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 835

<210> 50
 <211> 644
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ligando (71-254) monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11)

<400> 50

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

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

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

ES 2 847 973 T3

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

ES 2 847 973 T3

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu

ES 2 847 973 T3

<210> 51
<211> 826
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena (71-248) de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)

<400> 51

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

ES 2 847 973 T3

180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
210	215	220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly		
225	230	235
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
275	280	285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
305	310	315
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile		
325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
340	345	350
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
355	360	365
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val		
405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
420	425	430

ES 2 847 973 T3

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Gly Gly
625 630 635 640

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
645 650 655

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
660 665 670

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
675 680 685

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
 690 695 700

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
 705 710 715 720

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
 725 730 735

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
 740 745 750

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
 755 760 765

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
 770 775 780

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
 785 790 795 800

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
 805 810 815

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
 820 825

<210> 52
<211> 638
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ligando (71-248) monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11)

<400> 52

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
 50 55 60

ES 2 847 973 T3

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

ES 2 847 973 T3

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
 515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
 530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
 545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
 565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
 580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
 595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
 610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
 625 630 635

<210> 53
 <211> 809
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena de botón Fc de 4-1BBL hu (71-254) trimérico

<400> 53

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
 20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
 35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
 50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
 65 70 75 80

ES 2 847 973 T3

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
305 310 315 320

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
325 330 335

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
 340 345 350

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
 355 360 365

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly
 370 375 380

Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala
 385 390 395 400

Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln
 405 410 415

Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly
 420 425 430

Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr
 435 440 445

Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln
 450 455 460

Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser
 465 470 475 480

Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala
 485 490 495

Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn
 500 505 510

Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln
 515 520 525

Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp
 530 535 540

Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro
 545 550 555 560

Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Ser Pro Gly
 565 570 575

ES 2 847 973 T3

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
580 585 590

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
595 600 605

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
610 615 620

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
625 630 635 640

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
645 650 655

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
660 665 670

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
675 680 685

Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
690 695 700

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
705 710 715 720

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
725 730 735

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
740 745 750

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
755 760 765

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
770 775 780

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
785 790 795 800

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
805

ES 2 847 973 T3

<210> 54
<211> 1032
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de botón Fc anti-CD19(8B8-018) fusionada con 4-1BBL hu (71-254) trimérico
<400> 54

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 Asp Tyr
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

ES 2 847 973 T3

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

ES 2 847 973 T3

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu
645 650 655

Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg
660 665 670

ES 2 847 973 T3

Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp
675 680 685

Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu
690 695 700

Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala
705 710 715 720

Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val
725 730 735

Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln
740 745 750

Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp
755 760 765

Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln
770 775 780

Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
785 790 795 800

His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
805 810 815

Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820 825 830

Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
835 840 845

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
850 855 860

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
865 870 875 880

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
885 890 895

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
900 905 910

ES 2 847 973 T3

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
915 920 925

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
930 935 940

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
945 950 955 960

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
965 970 975

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
980 985 990

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
995 1000 1005

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro
1010 1015 1020

Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
1025 1030

<210> 55

<211> 1032

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11) fusionada con 4-1BBL hu (71-254) trimérico

<400> 55

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ES 2 847 973 T3

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

ES 2 847 973 T3

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

ES 2 847 973 T3

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Glu
645 650 655

Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg
660 665 670

Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp
675 680 685

Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu
690 695 700

Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala
705 710 715 720

Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val
725 730 735

Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln
740 745 750

Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp
755 760 765

Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln
770 775 780

ES 2 847 973 T3

Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
785 790 795 800

His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
805 810 815

Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820 825 830

Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
835 840 845

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
850 855 860

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
865 870 875 880

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
885 890 895

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
900 905 910

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
915 920 925

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
930 935 940

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
945 950 955 960

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
965 970 975

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
980 985 990

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
995 1000 1005

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro
1010 1015 1020

ES 2 847 973 T3

Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
1025 1030

<210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD3-HCDR1

<400> 56

Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 57
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD3-HCDR2

<400> 57

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

Val Lys Gly

<210> 58
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD3-HCDR3

<400> 58

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

<210> 59
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD3-LCDR1
<400> 59

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

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD3-LCDR2

<400> 60

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD3-LCDR3

<400> 61

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 62
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD3 VH

<400> 62

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

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

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

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

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

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

ES 2 847 973 T3

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

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

<210> 63
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD3 VL

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

<210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD20-HCDR1

<400> 64

Tyr Ser Trp Ile Asn
1 5

<210> 65
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CD20-HCDR2

<400> 65

Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	Lys
1				5				10						15	

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CD20-HCDR3

<400> 66

Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr
1				5					10

<210> 67
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CD20-LCDR1

<400> 67

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5				10					15		

<210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CD20-LCDR2

<400> 68

Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Val	Ser
1				5		

<210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CD20-LCDR3

<400> 69

ES 2 847 973 T3

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 70
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD20 VH

<400> 70

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 71
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD20 VL

<400> 71

ES 2 847 973 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val 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 Ala Gln Asn
85 90 95

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

Arg Thr Val
115

<210> 72
<211> 445
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal Fc DP47

<400> 72

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

ES 2 847 973 T3

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

ES 2 847 973 T3

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
385					390					395					400

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 73
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera DP47

<400> 73

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

ES 2 847 973 T3

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

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 74

<211> 834

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena de ojal Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu (71-254) dimérico

<400> 74

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

ES 2 847 973 T3

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

ES 2 847 973 T3

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
450 455 460

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
465 470 475 480

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
485 490 495

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
500 505 510

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
515 520 525

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
530 535 540

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
545 550 555 560

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser

ES 2 847 973 T3

565	570	575
Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu		
580	585	590
Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala		
595	600	605
Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe		
610	615	620
Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu		
625	630	635
640		
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu		
645	650	655
Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe		
660	665	670
Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser		
675	680	685
Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu		
690	695	700
Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val		
705	710	715
720		
Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu		
725	730	735
Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser		
740	745	750
Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala		
755	760	765
Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu		
770	775	780
His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala		
785	790	795
800		
Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly		
805	810	815

ES 2 847 973 T3

Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg
820 825 830

Ser Glu

<210> 75
<211> 640
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de botón Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu (71-254) monomérico
<400> 75

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

ES 2 847 973 T3

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

ES 2 847 973 T3

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
450 455 460

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
465 470 475 480

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
485 490 495

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
500 505 510

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
515 520 525

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
530 535 540

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
545 550 555 560

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
565 570 575

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
580 585 590

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
595 600 605

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
610 615 620

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
625 630 635 640

<210> 76
<211> 672
<212> PRT

ES 2 847 973 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CD20 VH-CH1 (EE)-CD3 VL-CH1-Fc (botón, P329G LALA) CD20 VH-CH1 (EE)-CD3 VL-CH1-Fc (botón, P329G LALA)

<400> 76

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

ES 2 847 973 T3

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly
210 215 220

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

Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly
245 250 255

Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
260 265 270

Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys
275 280 285

Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly
290 295 300

Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu
305 310 315 320

Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly
325 330 335

Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
340 345 350

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
355 360 365

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
370 375 380

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
385 390 395 400

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
405 410 415

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
420 425 430

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
435 440 445

ES 2 847 973 T3

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
450 455 460

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
465 470 475 480

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
485 490 495

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
500 505 510

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
515 520 525

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
530 535 540

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
545 550 555 560

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
565 570 575

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
580 585 590

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
595 600 605

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
610 615 620

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
625 630 635 640

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
645 650 655

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
660 665 670

<210> 77

<211> 447

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CD20 VH-CH1 (EE)-Fc (ojal, P329G LALA)

ES 2 847 973 T3

<400> 77

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240

ES 2 847 973 T3

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 78

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CD20 VL-CL(RK)

<400> 78

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe 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 Ala Gln Asn
 85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
 115 120 125

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 79
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CD3 VH-CL

ES 2 847 973 T3

<400> 79

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 80
<211> 556
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met
1 5 10 15

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp
20 25 30

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln
35 40 45

Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
50 55 60

Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile
65 70 75 80

Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu
85 90 95

Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr
100 105 110

Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp
115 120 125

Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro
130 135 140

Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala
145 150 155 160

Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro
165 170 175

Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
180 185 190

ES 2 847 973 T3

Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
195 200 205

Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
210 215 220

Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
225 230 235 240

Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala
245 250 255

Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
260 265 270

Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
275 280 285

Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu
290 295 300

Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
305 310 315 320

Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val
325 330 335

Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu
340 345 350

Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
355 360 365

Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
370 375 380

Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly
385 390 395 400

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu
405 410 415

Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu
420 425 430

ES 2 847 973 T3

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

Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu
450 455 460

Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser
465 470 475 480

Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly
485 490 495

Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln
500 505 510

Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala
515 520 525

Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp
530 535 540

Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
545 550 555

<210> 81
<211> 297
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
1 5 10 15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg
20 25 30

Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu
35 40 45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile
65 70 75 80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile
 85 90 95

Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu
 100 105 110

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile
 115 120 125

Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser
 130 135 140

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
 145 150 155 160

Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
 165 170 175

Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly
 180 185 190

Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile
 195 200 205

Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys
 210 215 220

Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile
 225 230 235 240

Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro
 245 250 255

Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu
 260 265 270

Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser
 275 280 285

Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
 290 295

<210> 82
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 847 973 T3

<223> anti-CD20 B-Ly1 VH murino

<400> 82

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

Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu
20 25 30

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp
35 40 45

Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
50 55 60

Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
100 105 110

<210> 83

<211> 103

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anti-CD20 B-Ly1 VL murino

<400> 83

Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
20 25 30

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn
35 40 45

Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr
50 55 60

Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
65 70 75 80

ES 2 847 973 T3

Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
85 90 95

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100

<210> 84
<211> 207
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

```

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1           5                   10          15

```

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

ES 2 847 973 T3

Lys Glu Arg Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 85
<211> 198
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys
50 55 60

Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu
65 70 75 80

Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro
85 90 95

Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn
100 105 110

Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp
115 120 125

Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
130 135 140

Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
145 150 155 160

Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
165 170 175

ES 2 847 973 T3

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly
180 185 190

Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195

<210> 86
<211> 254
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
100 105 110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
115 120 125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
145 150 155 160

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
165 170 175

ES 2 847 973 T3

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
210 215 220

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

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 87
<211> 205
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15

Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro
20 25 30

Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala
35 40 45

Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro
50 55 60

Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp
65 70 75 80

Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe
85 90 95

Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val
100 105 110

Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala
115 120 125

ES 2 847 973 T3

Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg
130 135 140

Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly
145 150 155 160

Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala
165 170 175

Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr
180 185 190

Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
195 200 205

<210> 88
<211> 163
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

ES 2 847 973 T3

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 89
<211> 256
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 89

Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val
1 5 10 15

Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln
20 25 30

Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro
35 40 45

Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys
50 55 60

Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr
65 70 75 80

His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro
85 90 95

Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr
100 105 110

Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn
115 120 125

Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg

130 135 140

Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

ES 2 847 973 T3

Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu
 165 170 175

Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala
 180 185 190

Leu Thr Ser Ala Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe
 195 200 205

Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln
 210 215 220

Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser
 225 230 235 240

Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Gly Gly Gly Tyr Glu Leu
 245 250 255

<210> 90

<211> 254

<212> PRT

<213> macaco cangrejero

<400> 90

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
 1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro
 20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Ser Gln Ile Cys Ser Pro Cys
 35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
 50 55 60

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
 65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly
 85 90 95

Ala Glu Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
 100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
 115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
 130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
 145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala
 165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Phe Phe Leu Ala
 180 185 190

Leu Thr Ser Thr Val Val Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Val Leu Arg
 195 200 205

Phe Ser Val Val Lys Arg Ser Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 210 215 220

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 225 230 235 240

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 245 250

<210> 91
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> conector peptídico G4S
<400> 91

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 92
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> (G4S)2
<400> 92

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 93
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> (SG4)2

 <400> 93

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10

<210> 94
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> conector peptídico

 <400> 94

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5 10

<210> 95
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> conector peptídico

 <400> 95

Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser
 1 5 10

<210> 96
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> conector peptídico 2

 <400> 96

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 97
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector peptídico 3

<400> 97

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector peptídico 4

<400> 98

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5

<210> 99

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector peptídico 5

<400> 99

Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly
1 5

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector peptídico 6

<400> 100

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 101

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector peptídico 7

<400> 101

Gly Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 102

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector peptídico 8

<400> 102

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 103

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector peptídico 9

<400> 103

Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly
1 5

<210> 104

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector peptídico 10

<400> 104

Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 105

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector peptídico 11

<400> 105

Gly Gly Asn Gly Ser Gly
1 5

<210> 106

<211> 290

<212> PRT

ES 2 847 973 T3

<213> Homo sapiens

<400> 106

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

ES 2 847 973 T3

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285

Glu Thr
290

<210> 107
<211> 288
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 107

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

ES 2 847 973 T3

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 108

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH (PD-L1)

<400> 108

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

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

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

ES 2 847 973 T3

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

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 109
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL (PD-L1)

<400> 109

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 Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

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

<210> 110
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH (PD-L1) 2

<400> 110

ES 2 847 973 T3

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 111
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL (PD-L1) 2

<400> 111

ES 2 847 973 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 112

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH (PD-1)

<400> 112

ES 2 847 973 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val 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

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

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 113
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL (PD-1)

<400> 113

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 Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

ES 2 847 973 T3

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

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

<210> 114

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH (PD-1) 2

<400> 114

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 115

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 847 973 T3

<220>

<223> VL (PD-1) 2

<400> 115

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 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

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

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de zona marginal (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH), en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 se usa en combinación con un agonista de 4-1BB (CD137) y en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno con unión monovalente a CD19 que comprende tres ectodominios de 4-1BBL que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8,
- un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 y un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración EU).
2. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y el agonista de 4-1BB se administran juntos en una única composición o se administran por separado en dos o más composiciones diferentes.
3. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula que comprende tres ectodominios de 4-1BBL que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5.
4. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 no será internalizada por linfocitos B que expresan CD19.
5. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende
- (a) una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende: (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, o
 - (b) una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende (i) CDR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, (ii) CDR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y (iii) CDR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19), que comprende (iv) CDR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, (v) CDR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, y (vi) CDR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
6. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable la de cadena pesada (V_H CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, o en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada (V_H CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera (V_L CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.
7. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende
- (a) un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19,
 - (b) un primer y segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en el que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí mediante un conector peptídico y el segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo.
8. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 7, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende

(a) un dominio Fab que se puede unir específicamente a CD19 que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera (V_LCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera (V_LCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, y

(b) un primer y segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32; y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

9. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

10. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

11. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) y una región variable de la cadena ligera (V_LCD3) y un segundo dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD20) y una región variable de la cadena ligera (V_LCD20).

12. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el primer dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que comprende la secuencia CDR-H1 de SEQ ID NO: 56, la secuencia CDR-H2 de SEQ ID NO: 57 y la secuencia CDR-H3 de SEQ ID NO: 58; y/o una región variable de la cadena ligera (V_LCD3) que comprende la secuencia CDR-L1 de SEQ ID NO: 59, la secuencia CDR-L2 de SEQ ID NO: 60 y la secuencia CDR-L3 de SEQ ID NO: 61.

13. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el primer dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y/o una región variable de la cadena ligera (V_LCD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63.

14. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el segundo dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD20) que comprende la secuencia de CDR-H1 de SEQ ID NO: 64, la secuencia de CDR-H2 de SEQ ID NO: 65 y la secuencia de CDR-H3 de SEQ ID NO: 66, y/o una región variable de la cadena ligera (V_LCD20) que comprende la secuencia de CDR-L1 de SEQ ID NO: 67, la secuencia de CDR-L2 de SEQ ID NO: 68 y la secuencia de CDR-L3 de SEQ ID NO: 69.

15. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el segundo dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD20) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y/o una región variable de la cadena ligera (V_LCD20) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

16. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un tercer dominio de unión a antígeno que se une a CD20.

17. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración EU).

- 5 18. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 se usa en combinación con el agonista de 4-1BB (CD137) y en el que la combinación se administra a intervalos de aproximadamente una semana a tres semanas.
- 10 19. El anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que se realiza un pretratamiento con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferentemente obinutuzumab, antes de la politerapia, en el que el período de tiempo entre el pretratamiento y la politerapia es suficiente para la reducción de los linfocitos B en el individuo en respuesta al anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferentemente obinutuzumab.
- 15 20. Un producto farmacéutico que comprende (A) una primera composición que comprende como ingrediente activo un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (B) una segunda composición que comprende como ingrediente activo un agonista de 4-1BB que es una molécula de unión a antígeno con unión monovalente a CD19 que comprende tres ectodominios de 4-1BBL que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 y un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración EU), y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento combinado, secuencial o simultáneo de una enfermedad, en particular cáncer.
- 20 21. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un segundo medicamento que comprende un agonista de 4-1BB que es una molécula de unión a antígeno con unión monovalente a CD19 que comprende tres ectodominios de 4-1BBL que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 y un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración EU).
- 25 22. La composición farmacéutica de la reivindicación 21 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de zona marginal (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH).

30
35

Fig. 1

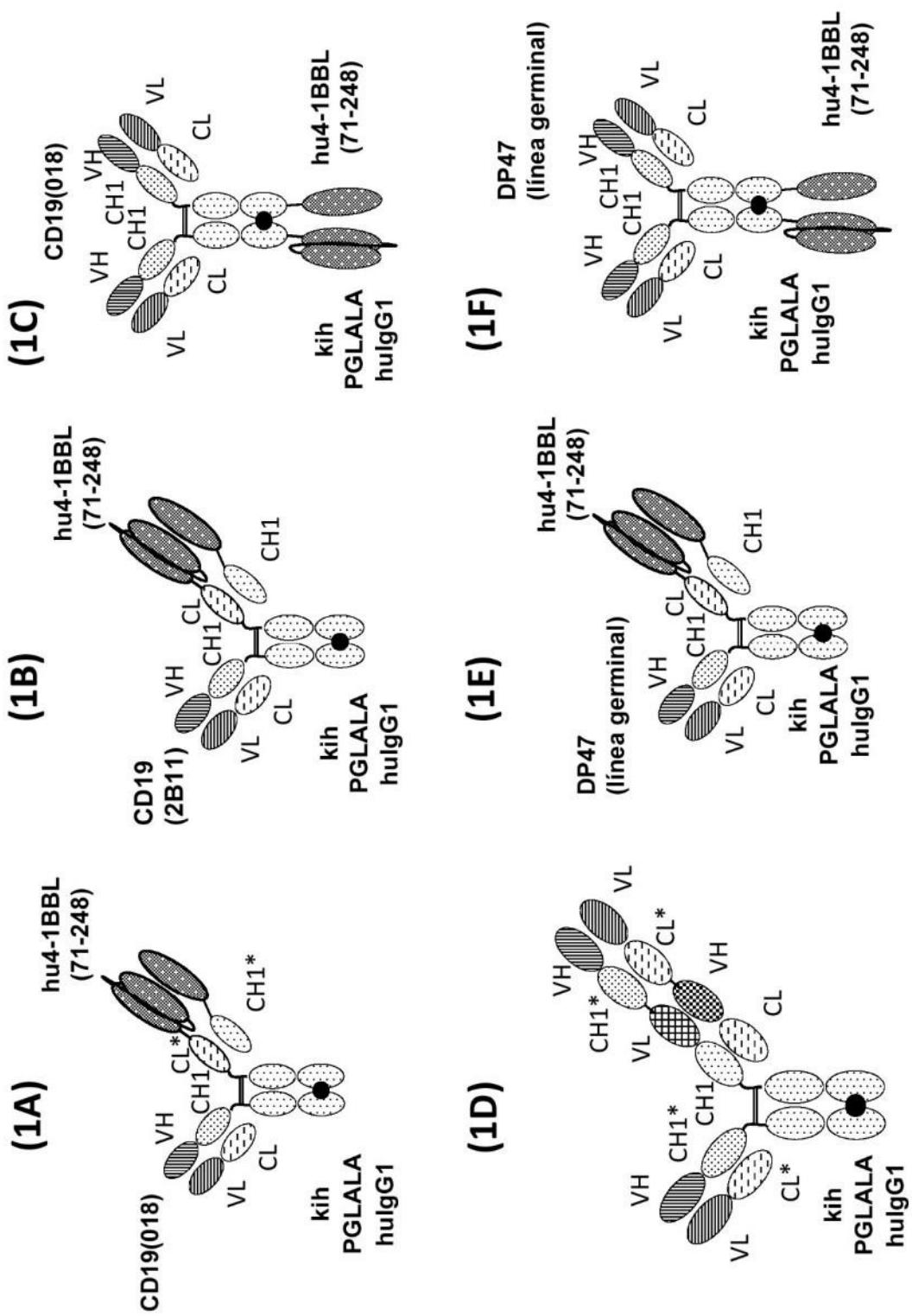


Fig. 2

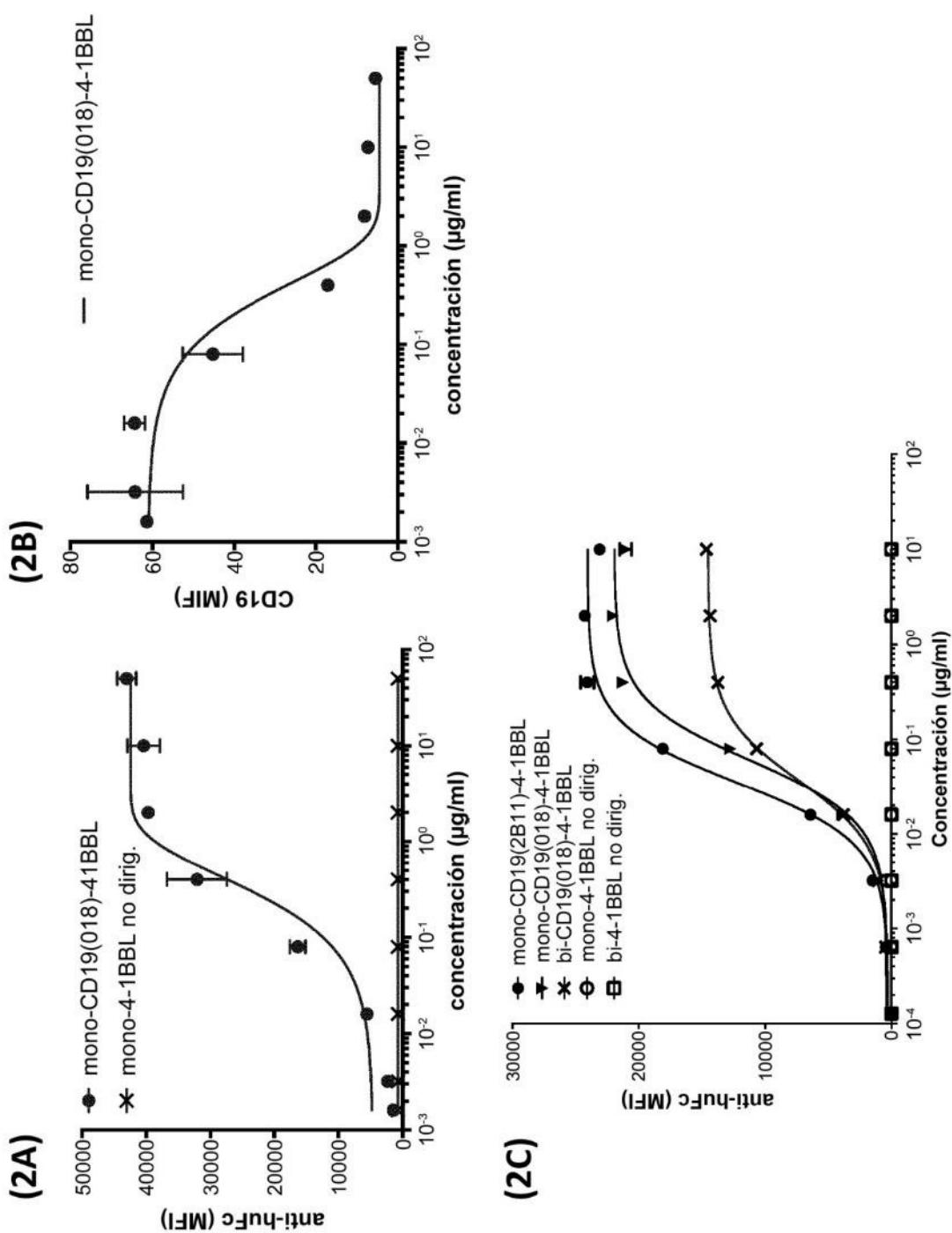
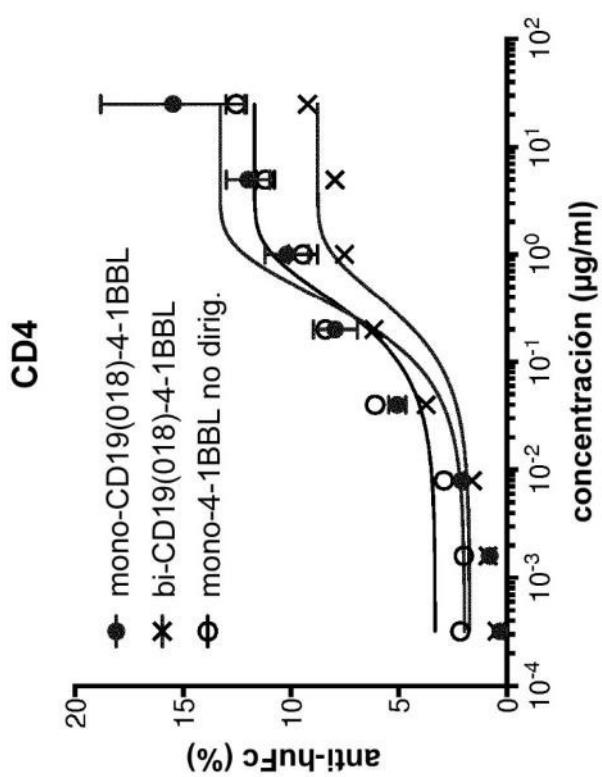


Fig. 3

(3A)



(3B)

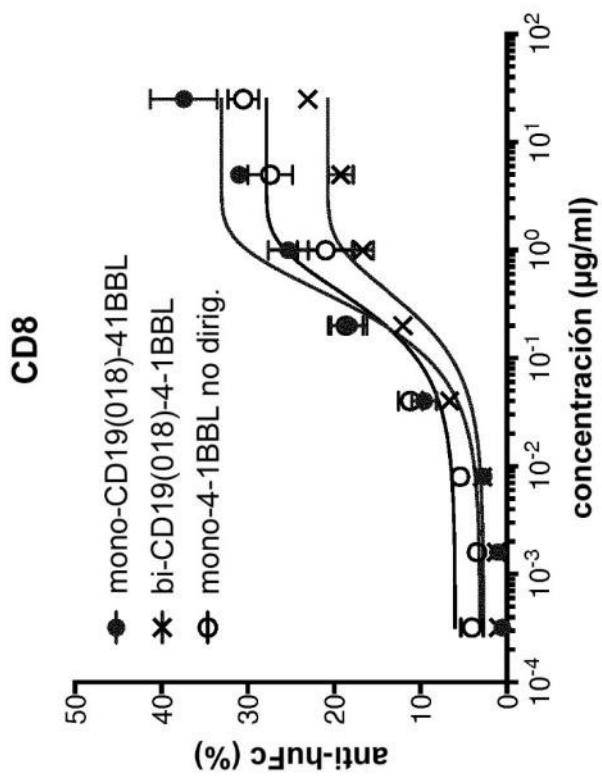


Fig. 4

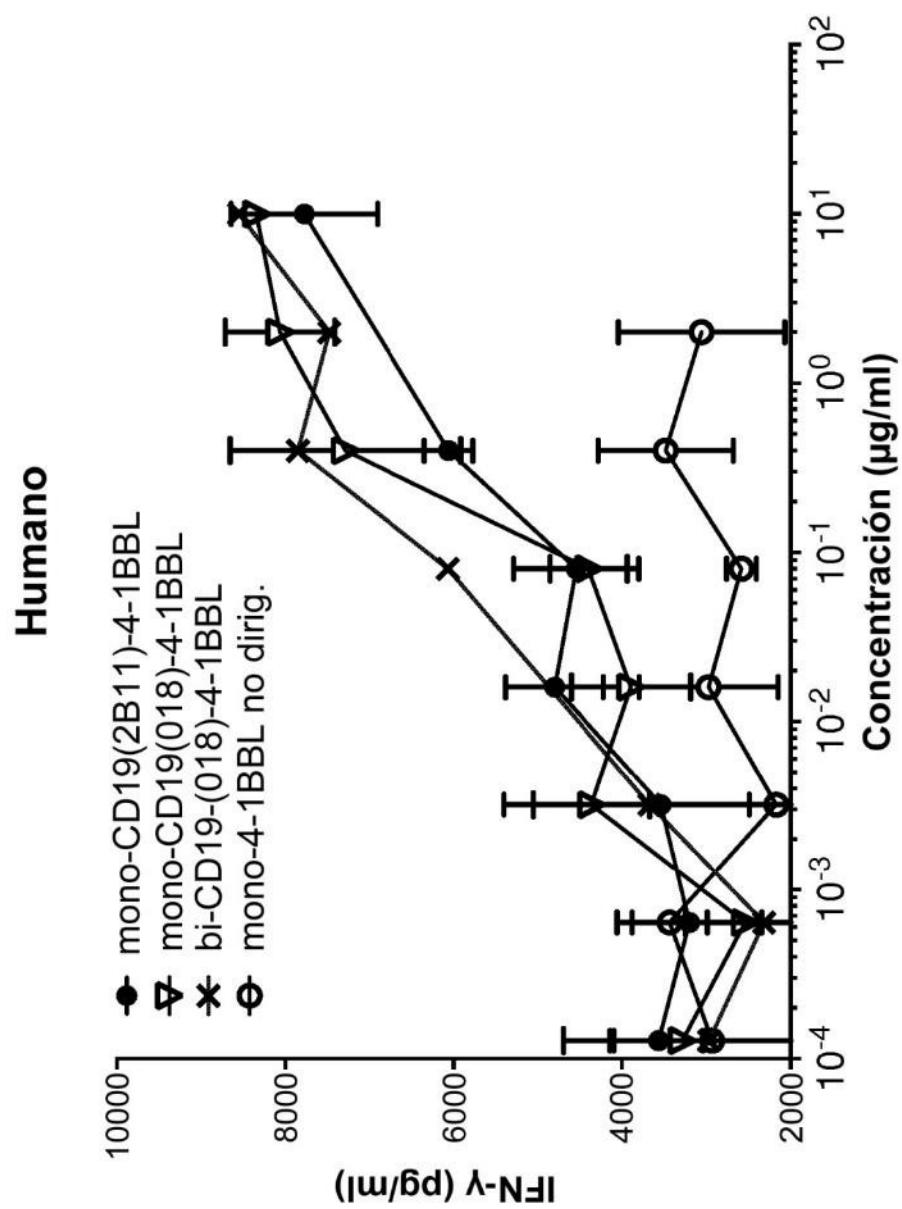


Fig. 5A

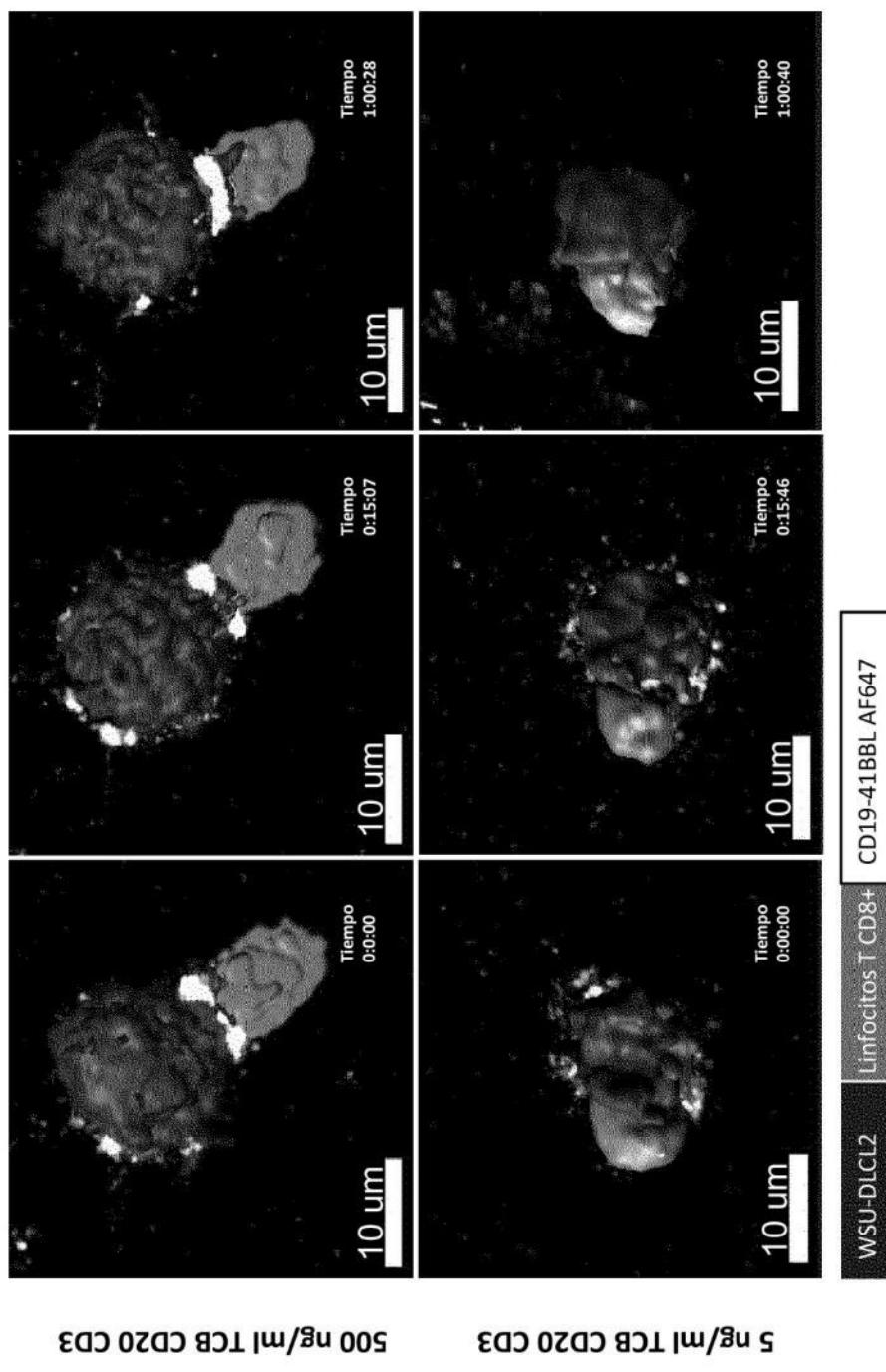


Fig. 5B

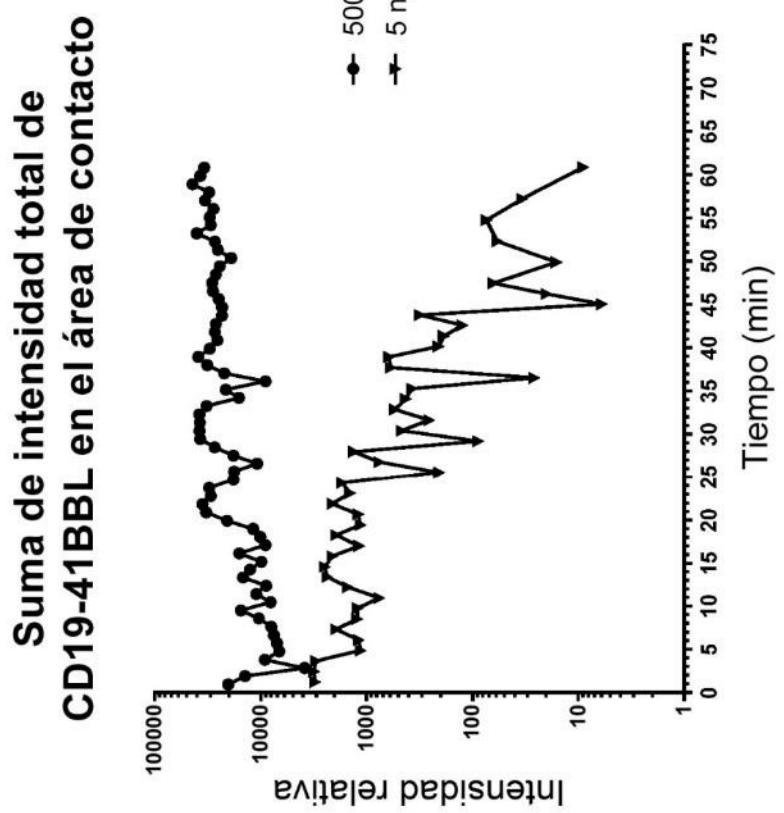


Fig. 6

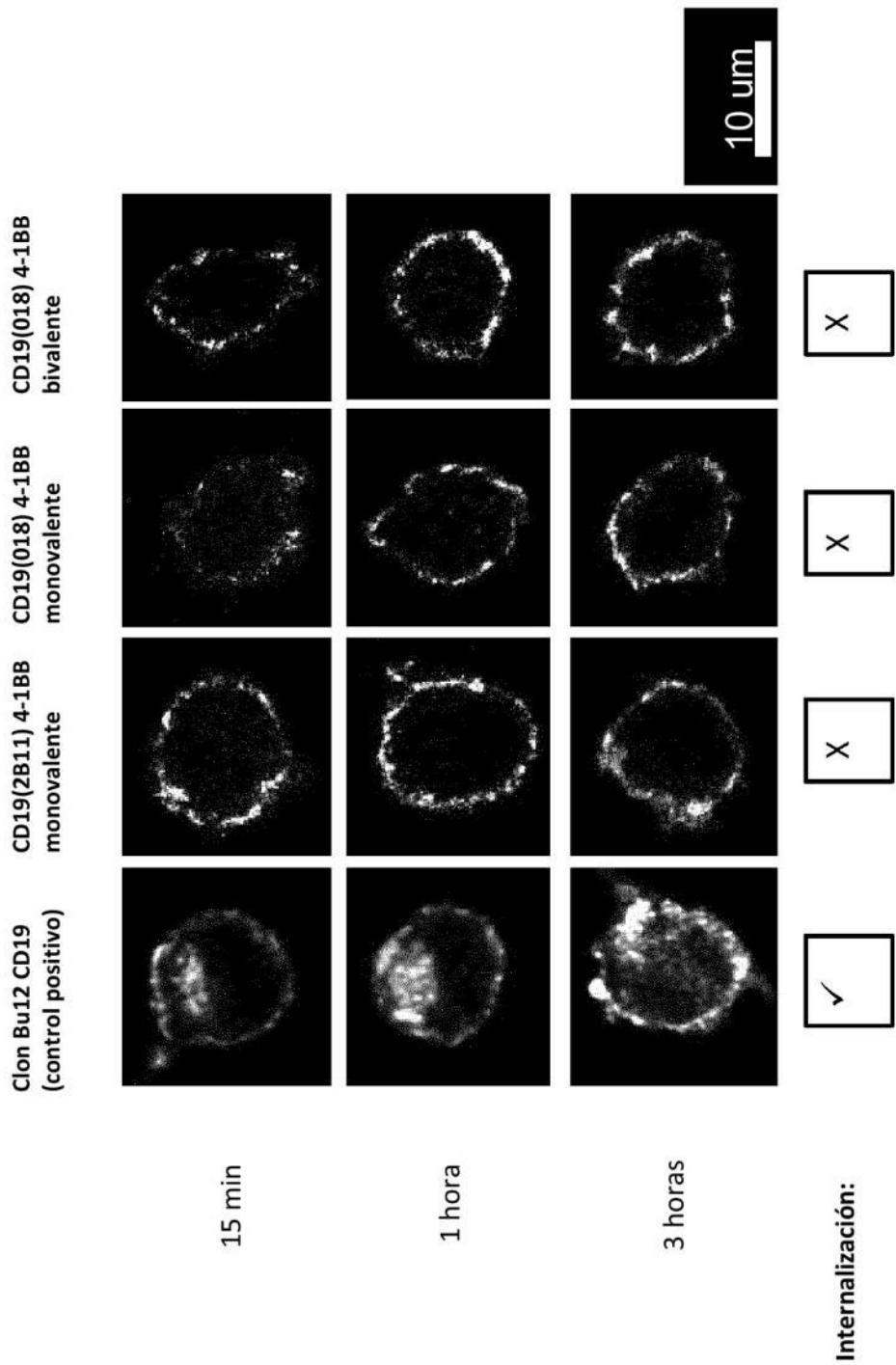


Fig. 7

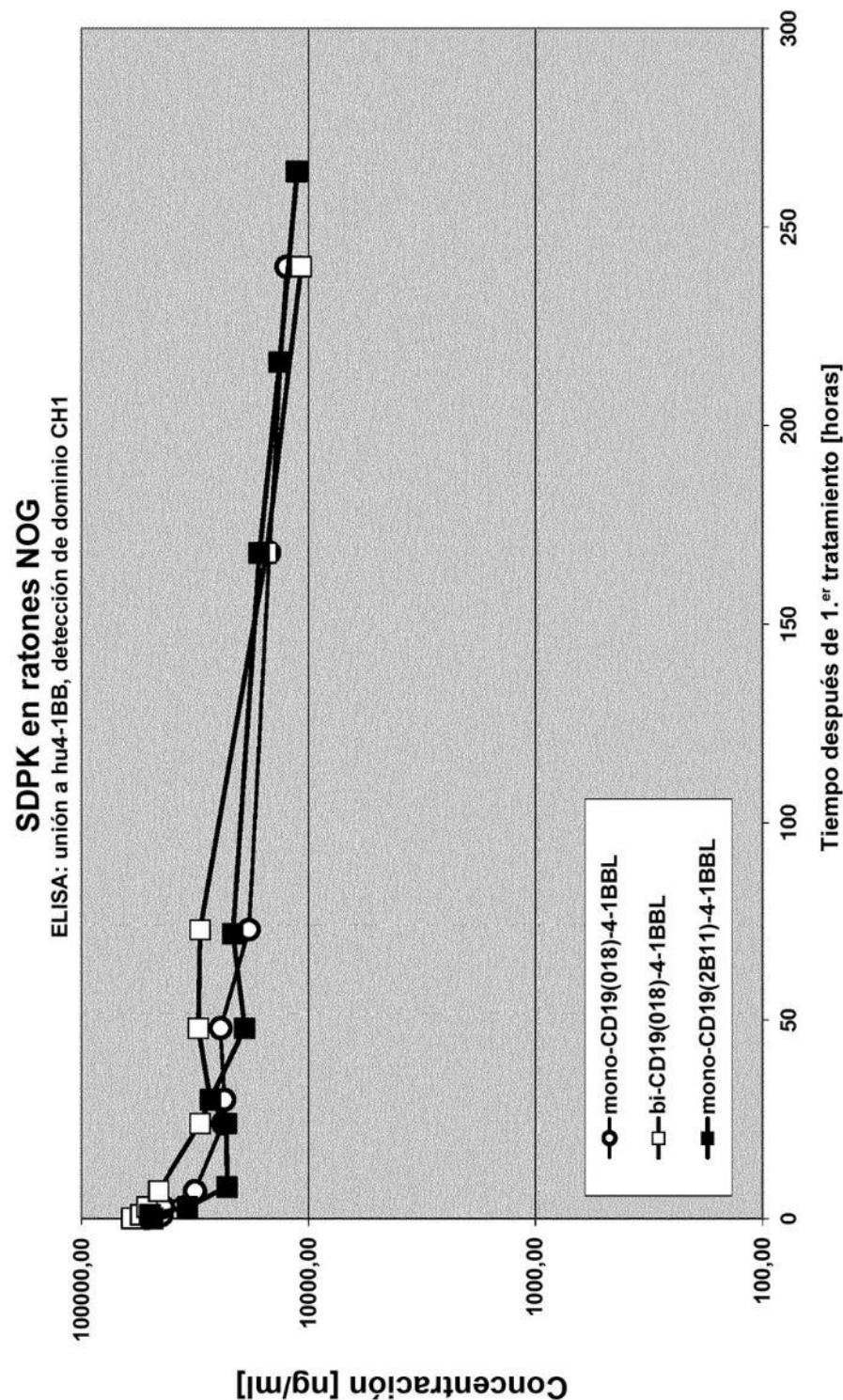
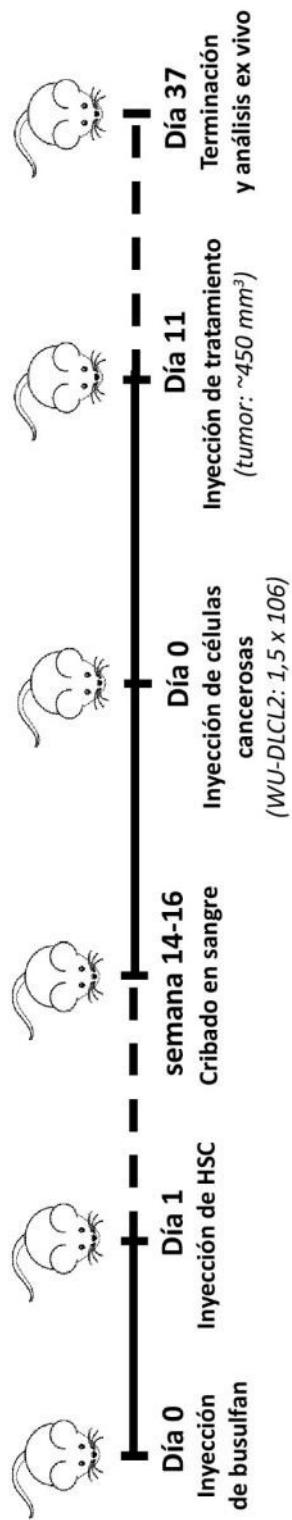


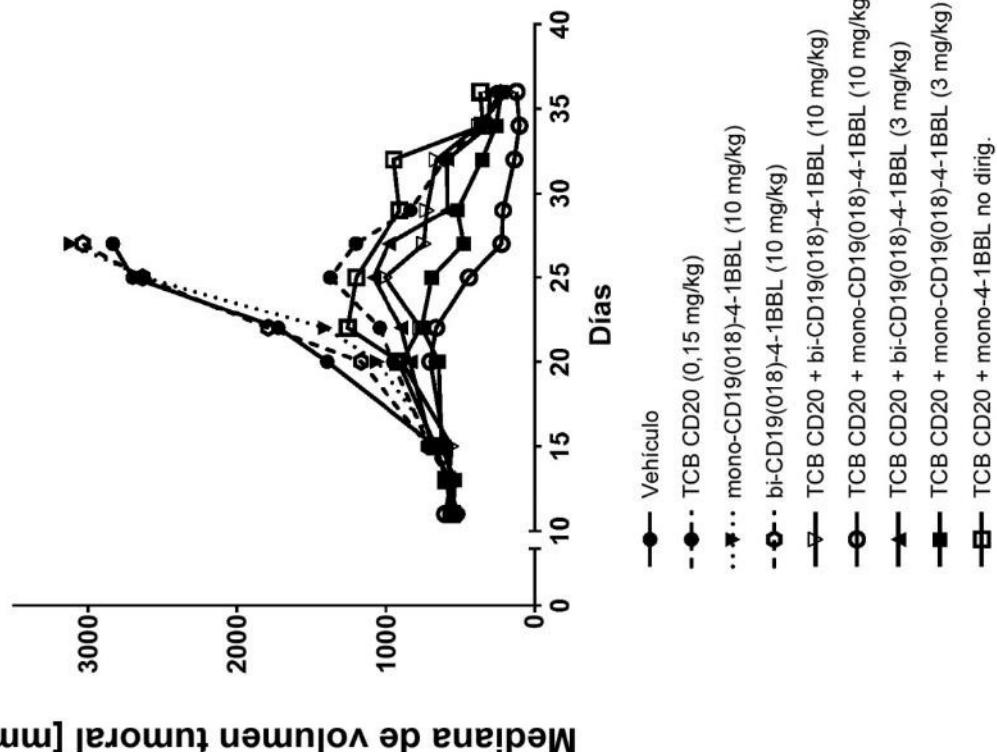
Fig. 8



Grupo	N.º de animales	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía de administración (tratamiento)	N.º de tratamientos
A	10	Vehículo	—	i.v.	4 (una vez por semana)
B	10	TCB CD20	0,15	i.v.	4 (una vez por semana)
C	10	mono-CD19(018)-4-1BBL	10	i.v.	4 (una vez por semana)
D	10	bi-CD19(018)-4-1BBL	10	i.v.	4 (una vez por semana)
E	10	TCB CD20 + mono-CD19(018)-4-1BBL	0,15 / 10	i.v.	4 (una vez por semana)
F	10	TCB CD20 + mono-CD19(018)-4-1BBL	0,15 / 3	i.v.	4 (una vez por semana)
G	10	TCB CD20 + bi-CD19(018)-4-1BBL	0,15 / 10	i.v.	4 (una vez por semana)
H	10	TCB CD20 + bi-CD19(018)-4-1BBL	0,15 / 3	i.v.	4 (una vez por semana)
I	10	TCB CD20 + mono-4-1BBL no dirig.	0,15 / 10	i.v.	4 (una vez por semana)

Fig. 9

(9A)



(9B)

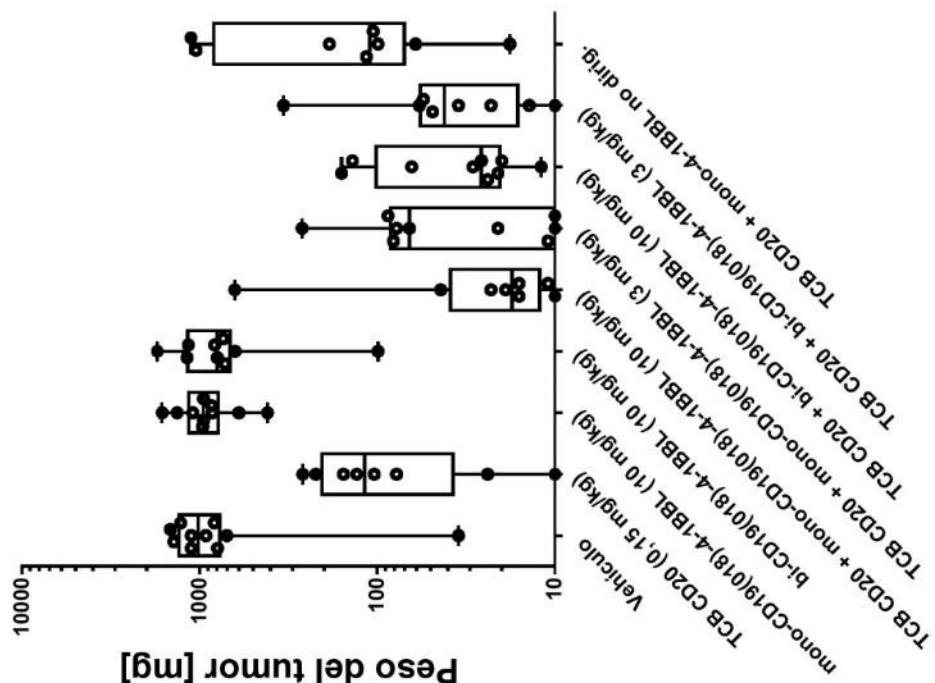
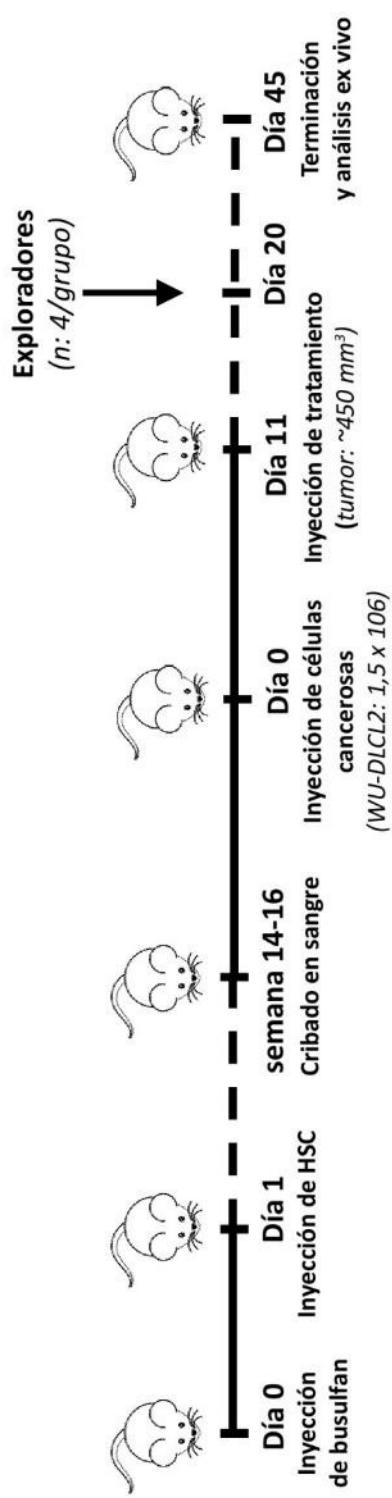


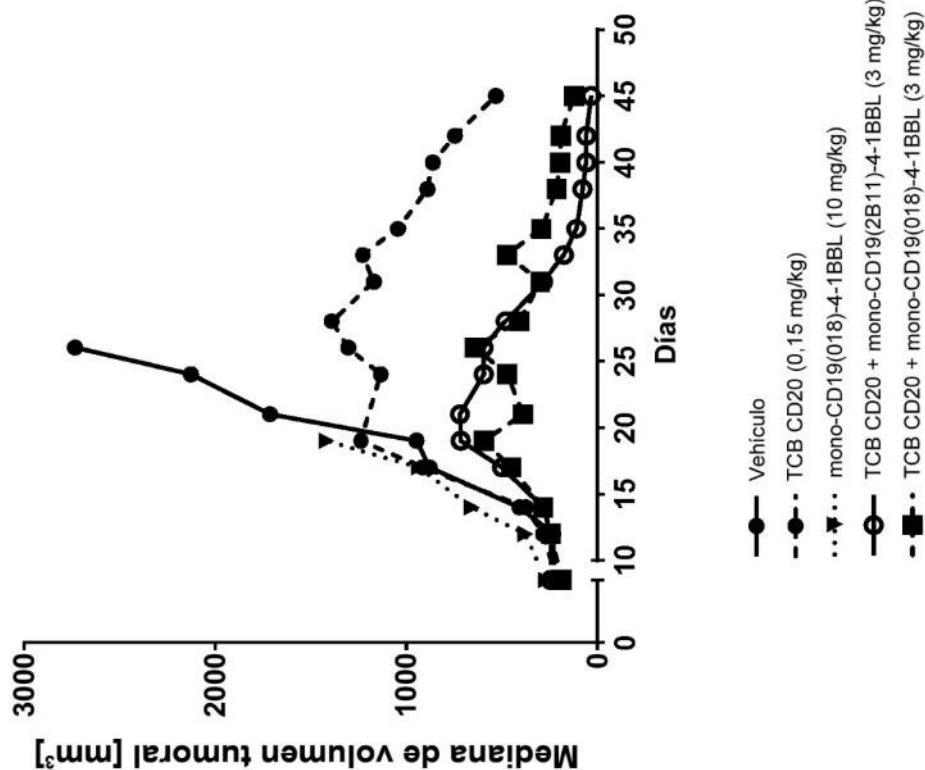
Fig. 10



Grupo	N.º de animales	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía de administración (tratamiento)	N.º de tratamientos
A	14	Vehículo	---	i.v.	5 (una vez por semana)
B	14	TCB CD20	0,15	i.v.	5 (una vez por semana)
C	4	mono-CD19(018)-4-1BBL	3	i.v.	5 (una vez por semana)
D	14	TCB CD20 + mono-CD19(2B11)-4-1BBL	0,15 / 3	i.v.	5 (una vez por semana)
E	14	TCB CD20 + mono-CD19(018)-4-1BBL	0,15 / 3	i.v.	5 (una vez por semana)

Fig. 11

(11A)



(11B)

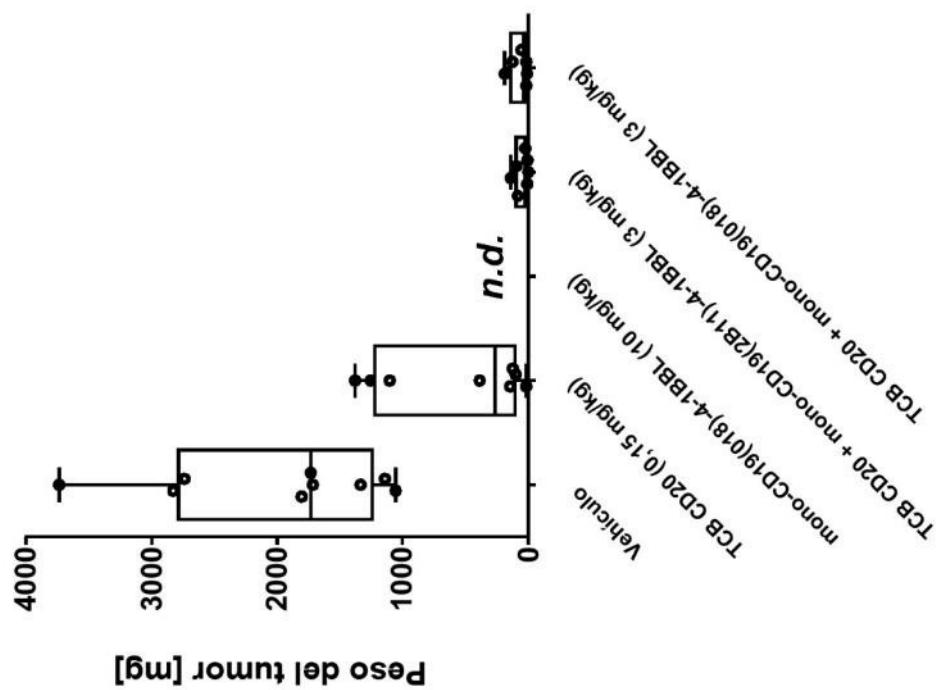


Fig. 12

