(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 871 045**

(51) Int. CI.:

A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2015 E 18207248 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.03.2021 EP 3489256**

(54) Título: **Moléculas de unión a antígeno que comprenden un trímero de ligando de la familia de TNF**

(30) Prioridad:

14.11.2014 EP 14193260
03.09.2015 EP 15183736
02.10.2015 EP 15188142

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2021

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

AMANN, MARIA;
BRUENKER, PETER;
CLAUS, CHRISTINA;
FERRARA KOLLER, CLAUDIA;
GRAU-RICHARDS, SANDRA;
KLEIN, CHRISTIAN;
LEVITSKI, VIKTOR;
MOESSNER, EKKEHARD;
REGULA, JOERG THOMAS y
UMAÑA, PABLO

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Moléculas de unión a antígeno que comprenden un trímero de ligando de la familia de TNF

Campo de la invención

La invención se refiere a moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF novedosas que comprenden (a) al menos una molécula 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 las que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que

(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 se une 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 que comprenden la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho 4-1BBL que comprende la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectado por medio de un conector peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o

(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 que comprenden la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y al extremo C del dominio CH3 mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho 4-1BBL que comprende la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas por medio de un conector peptídico al extremo C del dominio CH3 de dicho polipéptido, o

(iii) el primer polipéptido contiene un dominio VH-CL o VL-CH1 y el segundo polipéptido contiene un dominio VL-CH1 o un dominio VH-CL, respectivamente, en el que el segundo polipéptido se une 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 que comprenden la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y a VH o VL mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho 4-1BBL que comprende la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas por medio de un conector peptídico al VL o VH de dicho polipéptido, y

(c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable. La invención se refiere además a procedimientos para producir estas moléculas y a procedimientos para el uso de las mismas.

Antecedentes

Los ligandos que interactúan con moléculas de la superfamilia de receptores de TNF (factor de necrosis tumoral) tienen papeles fundamentales en la organización y función del sistema inmunitario. Mientras regulan las funciones normales tales como las respuestas inmunitarias, la hematopoyesis y la morfogénesis, los ligandos de la familia de TNF (también llamados citocinas) juegan un papel en la oncogénesis, el rechazo de trasplantes, el choque séptico, la replicación vírica, la resorción ósea, la artritis reumatoide y la diabetes (Aggarwal, 2003). La familia de ligandos de TNF comprende 18 genes que codifican 19 proteínas transmembranales tipo II (es decir, extremo N intracelular y extremo C extracelular), caracterizadas por la presencia de un dominio C terminal conservado denominado "dominio de homología de TNF" (THD). Este dominio es responsable de la unión al receptor y, por tanto, es crítico para la actividad biológica de los miembros de la familia de ligandos de TNF. La identidad de secuencia entre los miembros de la familia es ~ 20-30 % (Bodmer, 2002). Los miembros de la familia de ligandos de TNF ejercen su función biológica como trímeros no covalentes de autoensamblaje (Banner et al., Cell 1993, 73, 431-445). Por tanto, los ligandos de la familia de TNF forman un trímero que se puede unir a y activar los receptores correspondientes de la superfamilia de TNFR.

4-1BB (CD137), un miembro de la superfamilia de receptores del TNF, se ha identificado en primer lugar como una molécula cuya expresión se induce por la activación de linfocitos T (Kwon y Weissman, 1989). Estudios posteriores demostraron la expresión de 4-1BB en linfocitos T y B (Snell et al., 2011; Zhang et al., 2010), linfocitos NK (Lin et al., 2008), linfocitos NKT (Kim et al., 2008), monocitos (Kienzle y von Kempis, 2000; Schwarz et al., 1995),

neutrófilos (Heinisch et al., 2000), mastocitos (Nishimoto et al., 2005) y células dendríticas, así como células de origen no hematopoyético tal como las células endoteliales y del músculo liso (Broll et al., 2001; Olofsson et al., 2008). 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 (TCR) o del receptor de linfocitos B, así como la señalización que inducen moléculas coestimuladoras o receptores de citocinas proinflamatorias (Diehl et al., 2002; von Kempis et al., 1997; Zhang et al., 2010).

La expresión del ligando 4-1BB (4-1BBL o CD137L) está más restringida y se observa en células presentadoras de antígeno (APC) profesionales, tales como linfocitos B, células dendríticas (DC) y macrófagos. La expresión inducible de 4-1BBL es característica de los linfocitos T, incluyendo tanto subconjuntos de linfocitos T αβ como γδ, y células endoteliales (revisado en Shao y Schwarz, 2011).

Se sabe que la señalización de CD137 estimula la secreción de IFNγ y la proliferación de linfocitos NK (Buechele et al., 2012; Lin et al., 2008; Melero et al., 1998), así como también promueve la activación de DC, como se indica por su mayor supervivencia y capacidad para secretar citocinas y regular por incremento las moléculas coestimuladoras (Choi et al., 2009; Futagawa et al., 2002; Wilcox et al., 2002). Sin embargo, CD137 se caracteriza mejor como una molécula coestimuladora que modula la activación inducida por TCR en los subconjuntos CD4+ y CD8+ de linfocitos T. En combinación con la activación del TCR, los anticuerpos agonistas específicos 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 (revisado en Snell et al., 2011).

En consonancia con estos efectos coestimuladores de los anticuerpos 4-1BB sobre linfocitos T in vitro, su administración a ratones portadores de tumores da lugar a potentes efectos antitumorales en muchos modelos de tumores experimentales (Melero et al., 1997; Narazaki et al., 2010). Sin embargo, 4-1BB normalmente presenta su potencia como agente antitumoral solo cuando se administra en combinación con otros compuestos inmunomoduladores (Curran et al., 2011; Guo et al., 2013; Morales-Kastresana et al., 2013; Teng et al., 2009; Wei et al., 2013), reactivos quimioterapéuticos (Ju et al., 2008; Kim et al., 2009), vacunación específica para tumores (Cuadros et al., 2005; Lee et al., 2011) o radioterapia (Shi y Siemann, 2006). Los experimentos de disminución in vivo demostraron que los linfocitos T CD8+ juegan el papel más crítico en el efecto antitumoral de los anticuerpos específicos de 4-1BB. Sin embargo, dependiendo del modelo tumoral o del tratamiento combinado, que incluye anti-4-1BB, se han reportado contribuciones de otros tipos de células tales como DC, linfocitos NK o linfocitos T CD4+ (Melero et al., 1997; Murillo et al., 2009; Narazaki et al., 2010; Stagg et al., 2011).

Además de sus efectos directos sobre diferentes subconjuntos de linfocitos, los agonistas 4-1BB también pueden inducir la infiltración y retención de linfocitos T activados en el tumor a través de la regulación por incremento mediada por 4-1BB de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1) y la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM1) en el endotelio vascular del tumor (Palazon et al., 2011).

La activación de 4-1BB también puede revertir el estado de anergia de los linfocitos T inducido por la exposición a un antígeno soluble que puede contribuir a la alteración de la tolerancia inmunológica en el microambiente tumoral o durante infecciones crónicas (Wilcox et al., 2004).

Parece que las propiedades inmunomoduladoras de los anticuerpos agonistas de 4-1BB in vivo requieren la presencia de la porción Fc natural en la molécula de anticuerpo, que implica, de este modo, la unión del receptor Fc como un acontecimiento importante requerido para la actividad farmacológica de dichos reactivos como se ha descrito para anticuerpos agonistas específicos de otros miembros inmunomoduladores o inductores de apoptosis de la superfamilia de TNFR (Li y Ravetch, 2011; Teng et al., 2009). Sin embargo, la administración sistémica de anticuerpos agonistas específicos de 4-1BB con el dominio Fc funcionalmente activo induce también la expansión de linfocitos T CD8+ asociada con toxicidad hepática (Dubrot et al., 2010) que disminuye o mejora significativamente en ausencia de receptores Fc funcionales en ratones. En ensayos clínicos en humanos (ClinicalTrials.gov, NCT00309023), los anticuerpos agonistas 4-1BB competentes en Fc (BMS-663513) administrados una vez cada tres semanas durante 12 semanas indujeron la estabilización de la enfermedad en pacientes con melanoma, carcinoma de células de ovario o renal. Sin embargo, el mismo anticuerpo administrado en otro ensayo (NCT00612664) causó hepatitis de grado 4 que dio lugar a la finalización del ensayo (Simeone y Ascierto, 2012).

Conjuntamente, los datos preclínicos y clínicos disponibles demuestran claramente que existe una gran necesidad clínica de agonistas 4-1BB eficaces. Sin embargo, los candidatos a fármacos de nueva generación no solo deberían comprometer eficazmente el 4-1BB en la superficie de las células hematopoyéticas y endoteliales, sino que también deberían ser capaces de lograrlo a través de mecanismos distintos de la unión a receptores Fc para evitar efectos secundarios incontrolables. Esto último se puede lograr mediante la unión preferencial y la oligomerización de restos específicos de tumor o asociados a tumor.

Se han creado proteínas de fusión compuestas por un dominio extracelular de un ligando 4-1BB y un fragmento de anticuerpo monocatenario (Mueller et al., 2008; Hornig et al., 2012) o un único ligando 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 ectodominios de ligandos de TNF unidos entre sí y fusionados a una parte del anticuerpo.

Sin embargo, todavía existe la necesidad de nuevas moléculas de unión a antígeno que combinen un resto que se puede unir de forma preferente a dianas específicas de tumores o asociadas a tumores con un resto capaz de formar un trímero de ligando de TNF coestimulador y que tenga suficiente estabilidad para ser farmacéuticamente útil. Las moléculas de unión a antígeno de la presente invención comprenden ambas y sorprendentemente proporcionan un ligando de TNF trimérico y, por tanto, biológicamente activo, aunque uno de los ectodominios del ligando de TNF trimerizante se localiza en otro polipéptido diferente a los otros dos ectodominios de ligando de TNF de la molécula.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia del TNF que comprende

(a) al menos una molécula Fab 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 la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que

(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 se une 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 que comprenden la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho 4-1BBL que comprende la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectado por medio de un conector peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o

(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 que comprenden la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y al extremo C del dominio CH3 mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho 4-1BBL que comprende la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas por medio de un conector peptídico al extremo C del dominio CH3 de dicho polipéptido, o

(iii) el primer polipéptido contiene un dominio VH-CL o VL-CH1 y el segundo polipéptido contiene un dominio VL-CH1 o un dominio VH-CL, respectivamente, en el que el segundo polipéptido se une 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 que comprenden la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y a VH o VL mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho 4-1BBL que comprende la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas por medio de un conector peptídico al VL o VH de dicho polipéptido, y

(c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable.

En otro aspecto, el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 96.

Más en particular, el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene el trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende

(a) al menos una molécula 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 el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99; 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: 96, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene el trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende

(a) al menos una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD19, y

(b) un primer polipéptido que contiene un dominio CH1 o CL y un segundo polipéptido que contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en el que el segundo polipéptido se une al primer polipéptido por un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,

y en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho 4-1BBL que 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas por medio de un conector peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD19,

(b) un primer polipéptido que contiene un dominio CH1 y un segundo polipéptido que contiene un dominio CL, en el que el segundo polipéptido se une al primer polipéptido por un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,

y en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y al dominio CH1 mediante un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho 4-1BBL que 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas por medio de un conector peptídico al dominio CL de dicho polipéptido.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD19,

(b) un primer polipéptido que contiene un dominio CL y un segundo polipéptido que contiene un dominio CH1, en el que el segundo polipéptido se une al primer polipéptido por un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,

y en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y al dominio CL mediante un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho 4-1BBL que 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas por medio de un conector peptídico al dominio CH1 de dicho polipéptido.

En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF como se define anteriormente, en el que el conector peptídico es $(G4S)_2$, es decir, un conector peptídico de SEQ ID NO: 13. En un aspecto, el primer conector peptídico es $(G4S)_2$, el segundo conector peptídico es GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 57) y el tercer conector peptídico es $(G4S)_2$. En otro aspecto, el primer, segundo y tercer conector peptídico es $(G4S)_2$.

En otro aspecto, el dominio Fc es una IgG, en particular un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. Más en particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1. En un aspecto particular, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc.

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se define anteriormente en el presente documento, que comprende

(c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se puede asociar de manera estable, en el que el dominio Fc comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reduce la unión a un receptor Fc, en particular al receptor Fcγ.

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 una molécula de unión a antígeno que contiene un ligando de la familia de TNF trimérica de acuerdo con la invención que comprende un dominio Fc de IgG1 con las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración EU).

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que la molécula de unión a antígeno comprende

una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo las dos una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD19,

un primer péptido que comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas entre sí mediante un conector peptídico fusionado en su extremo C mediante un segundo conector peptídico a una segunda cadena pesada o ligera,

y un segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho 4-1BBL que 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 fusionado en su extremo C mediante un tercer conector peptídico a una segunda cadena ligera o pesada, respectivamente.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que el primer péptido que comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas entre sí mediante un primer conector peptídico se fusiona en su extremo C mediante un segundo conector peptídico a un dominio CH1 que es parte de una cadena pesada,

y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho 4-1BBL que 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 se fusiona en su extremo C mediante un tercer conector peptídico a un dominio CL que es parte de una cadena ligera.

Aún en otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que el primer péptido que comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas entre sí mediante un primer conector peptídico se fusiona en su extremo C mediante un segundo conector peptídico a un dominio CL que es parte de una cadena pesada,

y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho 4-1BBL que 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 se fusiona en su extremo C mediante un tercer conector peptídico a un dominio CH1 que es parte de una cadena ligera.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que el primer péptido que comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas entre sí mediante un primer conector peptídico se fusiona en su extremo C mediante un segundo conector peptídico a un dominio VH que es parte de una cadena pesada,

y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho 4-1BBL que 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 se fusiona en su extremo C mediante un tercer conector peptídico a un dominio VL que es parte de una cadena ligera.

Se proporciona además una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF,

en el que en el dominio CL contiguo al miembro de la familia de ligando de TNF, 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 ligando de TNF, los aminoácidos en la posición 147 (numeración UE) y en la posición 213 (numeración UE) se han sustituido por ácido glutámico (E).

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que la molécula de unión a antígeno comprende

(a) una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD19, y

(b) una segunda cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99, y

una segunda cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

Aún en otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana, y

(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 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 que comprenden 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y al extremo C del dominio CH3 mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho 4-1BBL que 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas por medio de un conector peptídico al extremo C del dominio CH3 de dicho polipéptido.

En particular, dicha molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende dos restos que se pueden unir específicamente a CD19.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula Fab 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: 195 o SEQ ID NO: 252, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 196 o SEQ ID NO: 253, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 197 o SEQ ID NO: 254, y un dominio VL que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 198 o SEQ ID NO: 249, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 199 o SEQ ID NO: 250, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 200 o SEQ ID NO: 251.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula Fab que se puede unir específicamente a CD19 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 o en la que la molécula Fab que se puede unir específicamente a FAP comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en el que la molécula de unión a antígeno comprende

(i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 o

una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358,

(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 111 y SEQ ID NO: 113, y

(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112 y SEQ ID NO: 114.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que la molécula de unión a antígeno comprende

(i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 o

una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358,

(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119 y SEQ ID NO: 173, y

(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120 y SEQ ID NO: 174.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende dos restos que se pueden unir específicamente a CD19. En particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en el que la molécula de unión a antígeno comprende

(i) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 209, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 210 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, o

(ii) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 213, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 214 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, o

(iii) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 310 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 279, o

(iv) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 313, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 314 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 279.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF como se define anteriormente en el presente documento. La invención proporciona además un vector, en particular, un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado de la invención, y una célula huésped que comprende el polinucleótido aislado o el vector de expresión de la invención. En algunos modos de realización, la célula huésped es una célula eucariota, en particular una célula de mamífero.

En otro aspecto se proporciona un procedimiento de producción de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, que comprende las etapas de (i) cultivar la célula huésped de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno y (ii) recuperar la molécula de unión a antígeno. La invención también engloba una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF producida por el procedimiento de la invención.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención también engloba la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, o la composición farmacéutica de la invención, para su uso como medicamento. En un aspecto se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesita el mismo. En un modo de realización específico, se proporciona la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento del cáncer.

También se proporciona el uso de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesita el mismo, en particular para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** muestra los componentes para el ensamblaje de ligandos 4-1BB humanos triméricos divididos. La figura (1A) muestra el ligando dimérico que se fusiona en el extremo C con un dominio CH1 o CL humano o un dominio VL o VH y la figura (1B) muestra el ligando monomérico fusionado con el dominio CL o CH1 humano o un dominio VL o VH. La figura (1C) muestra el ligando dimérico que se fusiona en el extremo N con un dominio CH3 humano y la figura (1D) muestra el ligando monomérico fusionado en el extremo N con un dominio CH3 humano.

La **figura 2** muestra las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero 4-1BBL; construcciones 1.1 a 1.10 de la invención. La preparación y producción de estas construcciones se describe en el ejemplo 1. Los dominios VH y VL son los del anticuerpo anti-FAP 28H1, 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 3** muestra los componentes para el ensamblaje de ligandos 4-1BB murinos triméricos divididos. La figura (3A) muestra el ligando dimérico que se fusiona en el extremo C con el dominio CL murino y la figura (3B) muestra el ligando monomérico fusionado en el extremo C con el dominio CH1 murino. Componentes para el ensamblaje del ligando 4-1BB murino trimérico dividido dirigido a FAP. La figura (3C) muestra las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero 4-1BBL murino ensambladas como se describe con más detalle en el ejemplo 1.3.

La **figura 4** muestra las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero 4-1BBL; construcciones 2.1 a 2.6 de la invención. La preparación y producción de estas construcciones se describe en el ejemplo 2. Los dominios VH y VL son los del anticuerpo anti-FAP 4B9, 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 5A** y la **figura 5B** muestran las variantes "no dirigidas" de las construcciones 1.1 y 1.2 que comprenden una molécula Fab DP47 en lugar de la molécula Fab anti-FAP. Las moléculas se denominan control A y control B, respectivamente. La preparación se describe en el ejemplo 1.4. La **figura 5C** es un dibujo de la construcción de (kih) de Fc 4-1BB monomérico preparada en el ejemplo 3.

La **figura 6** se refiere a la unión de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP (trímero 4-1BBL dividido de FAP, círculos rellenos) o molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB no dirigido a DP-47 (trímero 4-1BBL dividido de DP47, círculos abiertos) a PMBC humanas en reposo (indiferenciadas) o activadas. Específicamente, la unión a los linfocitos T CD8+ humanos en reposo (indiferenciados) o activados se muestra en la figura (6A), a los linfocitos T CD4+ humanos en reposo (indiferenciados) o activados en la figura (6B) y a los linfocitos NK humanos en reposo (indiferenciados) o activados en la figura (6C). Se muestra la unión como mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) del fragmento F(ab')2 de IgG caprino específico de Fcγ de anti-IgG humana marcado con ficoeritrina (R-PE) de algas macrofíticas rojas, el cual se usa como anticuerpo de detección secundaria. La MFI se midió mediante citometría de flujo y el valor de referencia se corrigió restando la MFI del control en blanco.

En la **figura 7** se muestra la unión de diferentes construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP con linfocitos T que expresan 4-1BB humano de PHA-L y proleucina preactivada y PBMC humanas reactivadas anti-CD3 humana/anti-CD28 humana. La unión se detectó con el fragmento F(ab')2 de IgG caprino específico de Fcγ de anti-IgG humana conjugado con R-ficoeritrina-fluorocromo. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) frente a la concentración de las construcciones sometidas a prueba 1.1 a 1.10 del ejemplo 1. Para una mejor visualización, las curvas de unión se dividen en cuatro transferencias diferentes con construcción 1.1 ((kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido a FAP monovalente) y control B ((kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido no dirigido monovalente con cruce de CH-CL y residuos cargados) como curvas de comparación. La unión se controló en linfocitos T CD3+ CD8+ (figura 7A) y linfocitos T CD3+ CD4+ (figura 7B). El nivel de expresión de 4-1BB en los linfocitos T CD8 es normalmente más alto que en los linfocitos T CD4. Todas las versiones se unen con una afinidad bastante similar al 4-1BB humano.

La **figura 8** muestra la unión de diferentes construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP con linfocitos T CD4+ o CD8+ de PBMC frescos (figura 8A) o con 4-1BB humano que expresa PHA-L y proleucina preactivada y PBMC humanas reactivadas anti-CD3 humana/anti-CD28 humana (figura 8B). La unión se detectó con el fragmento F(ab')2 de IgG caprino específico de Fcγ de anti-IgG humana conjugado con R-ficoeritrina-fluorocromo. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) frente a la concentración de las construcciones sometidas a prueba 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6 del ejemplo 2 y las moléculas de control Control B, Control C, Control E y Control F. Para una mejor visualización de las curvas de unión se dividen en dos transferencias diferentes con la construcción 2.1 ((kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido

dirigido a FAP monovalente) y control B ((kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido no dirigido monovalente con cruce de CH-CL y residuos cargados) como curvas de comparación. La unión se supervisó en linfocitos T CD45+ CD3+ CD8+ (transferencias en la parte inferior) y linfocitos T CD45+ CD3+ CD4+ (transferencias en la parte superior). El nivel de expresión de 4-1BB en los linfocitos T CD8 es normalmente más alto que en los linfocitos T CD4. Todas las construcciones se unen con una afinidad bastante similar al 4-1BB humano, mientras que la construcción bivalente 2.3 y su control C no dirigido muestran una MFI más baja. Esto se puede deber al impedimento estérico de la unión de 4-1BB y/o menos detección debido al segundo anticuerpo de detección inducido por el ligando 4-1BB dividido conjugado con Fc.

En la **figura 9**, se muestra la unión de moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP (trímero 4-1BBL dividido de FAP, círculos rellenos) o moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB no dirigido a DP47 (trímero 4-1BBL dividido de DP47; círculos abiertos) con esplenocitos de ratón activados. En particular, la unión a linfocitos T CD4+ de ratón activados se muestra en la figura (9A) y a linfocitos T CD8+ de ratón activados en la figura (9B). Se usó un anticuerpo LALA P329G de IgG1 humano específico de anti-CD137 ratón (clon Lob12.3) como control positivo (triángulos). La unión se caracteriza por el trazado de la MFI del fragmento $F(ab')_2$ de IgG caprino específico de Fcγ de anti-IgG humana marcado con R-PE que se usa como anticuerpo de detección secundario frente a la concentración en nM de las construcciones del trímero 4-1BBL dividido sometido a prueba. La MFI se midió mediante citometría de flujo y el valor de referencia se corrigió restando la MFI del control en blanco.

La **figura 10** muestra la unión de moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB (círculos rellenos: molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP, construcción 1.1, círculos abiertos: molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB no dirigido a DP47, control A, a la línea celular MV-3 (A) y la línea celular WM-266-4 (B) de melanoma humano que expresan proteína de activación de fibroblastos (FAP). La unión se caracteriza por el trazado de la MFI del fragmento $F(ab')_2$ de IgG caprino específico de Fcγ de anti-IgG humana marcado con R-PE que se usa como anticuerpo de detección secundario frente a la concentración en nM de las construcciones del trímero 4-1BBL dividido sometido a prueba. La MFI se midió mediante citometría de flujo y el valor de referencia se corrigió restando la MFI del control en blanco.

En la **figura 11**, se muestra la unión de diferentes construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP a células MV-3 de melanoma humano que expresan FAP humana (figura 11A) y/o células de fibroblastos embrionarios de ratón transfectado del clon 39 de NIH/3T3-huFAP (figura 11B). La unión se detectó con fragmentos F(ab')2 de IgG caprinos específicos de Fcγ de anti -IgG humana conjugados con R-ficoeritrina-fluorocromo o fluoresceína-fluorocromo. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) frente a la concentración de construcciones sometidas a prueba. Para una mejor visualización, las curvas de unión se distribuyeron en cuatro (figura 11A) o dos transferencias (figura 11B), mientras que la construcción 1.1 ((kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido a FAP monovalente) se usa como curva de comparación. Todas las construcciones se unen con una afinidad similar a la FAP humana, excepto las construcciones dirigidas a FAP bivalente (construcciones 1.5, 1.7 y 1.8). Mostraron una tendencia a tener valores de EC50 más bajos y una intensidad de fluorescencia media más baja. Esto se puede explicar con su direccionamiento bivalente (mayor avidez, menos moléculas se pueden unir al mismo tiempo debido a la ocupación de dos epítopos que dan como resultado una MFI más baja). Las diferencias estructurales también pueden explicar la diferencia entre la construcción 1.8 (direccionamiento bivalente completo) y las construcciones 1.5 y 1.7 (solo direccionamiento bivalente parcial).

En la **figura 12**, se muestra la unión de diferentes construcciones 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6 (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP a FAP humana que expresa células MV-3 de melanoma humano (figura 12A) y células WM-266-4 (figura 12B). La unión se detectó con los fragmento F(ab')2 de IgG caprinos específicos de Fcγ de anti -IgG humana conjugados con R-ficoeritrina-fluorocromo. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) frente a la concentración de construcciones sometidas a prueba. Para una mejor visualización, las curvas de unión se distribuyeron en dos transferencias, mientras que la construcción 2.1 ((kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido a FAP monovalente) se usa como curva de comparación. Todas las construcciones se unen con una afinidad similar a la FAP humana, excepto la construcción 2.3 dirigida a FAP bivalente. Tiene una tendencia a mostrar valores de EC50 más bajos y una intensidad de fluorescencia media más baja. Esto se puede explicar con su direccionamiento bivalente, que da como resultado una mayor avidez pero menos ocupación o moléculas de FAP en la superficie celular, lo que da como resultado una MFI más baja.

La **figura 13** muestra la unión de diferentes construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB de ratón trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP a linfocitos T CD4+ o CD8+ de esplenocitos frescos (figura 13A) o a esplenocitos de ratón activados de anticuerpos agonistas monoclonales anti-CD3 de ratón/anti-CD28 de ratón que expresan 4-1BB de ratón (figura 13B). La unión se detectó con el fragmento F(ab'F)2 de IgG caprino específico de Fcγ de anti-IgG de ratón conjugado con FITC-fluorocromo. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) frente a la concentración de construcciones sometidas a prueba. La unión se controló en linfocitos T CD3+ CD8+ (transferencia izquierda) y linfocitos T CD3+ CD4+ (transferencia derecha). El nivel de expresión de 4-1BB en los

linfocitos T CD8 es normalmente más alto que en los linfocitos T CD4. Todas las construcciones se unen con una afinidad bastante similar al 4-1BB de ratón.

En la **figura 14** se demuestra la unión de diferentes construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB de ratón trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP a células tumorales que expresan FAP humana. La unión se detectó con el fragmento F(ab'F)2 de IgG caprino específico de Fγ de anti -IgG de ratón conjugado con FITC-fluorocromo. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) frente a la concentración de construcciones sometidas a prueba. La unión se supervisó en células MV-3 (figura 14A) y células WM-266-4 (figura 14B). Las construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB de ratón trimérico dividido dirigido a FAP M.1 y M.2 se unen con una afinidad bastante similar a FAP.

La **figura 15** muestra un esquema que ilustra el principio general del ensayo de actividad de NFkB descrito en el ejemplo 6.1 usando una línea celular indicadora. Se muestra el ensayo de activación configurado con 4-1BB humano que expresa la línea celular indicadora HeLa. Una reticulación de 4-1BB expresada en las células indicadoras induce la activación de NF κB y la expresión de luciferasa mediada por NF κB. Después de la lisis de las células, la luciferasa puede catalizar la oxidación de luciferina a oxiluciferina. Esta reacción química se correlaciona positivamente con la fuerza de la expresión de luciferasa mediada por NFκB y se puede medir por la fuerza de la emisión de luz (unidades de luz liberada). La proporción de células tumorales que expresan FAP con respecto a la línea celular indicadora HeLa-huCD137-NFkB-luc fue de 5 a 1.

En la **figura 16** se muestra que la activación de la vía de señalización de NFkB por la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP (construcción 1.1) depende estrictamente de su unión a las células diana que expresan FAP. Se cocultivaron células HeLa indicadoras de NFκB que expresaban CD137 humano con las células tumorales indicadas que presentan diferentes niveles de expresión de FAP en la superficie celular. La actividad luciferasa se evaluó como se describe en el ejemplo 6.1 después de cultivar células en ausencia o presencia de moléculas que contienen 4-1BBL a las concentraciones indicadas durante 6 horas. Los círculos rellenos se refieren a la construcción 1.1. Los círculos abiertos se refieren a la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB no dirigido a DP47 (control A). Se usó el clon 39 de FAP NIH/3T3-humana de la línea celular como células diana en el gráfico (A), el gráfico (B) muestra la activación con la línea celular MV3 como células diana y el gráfico (C) con la línea celular WM-266-4 como células diana. La actividad se caracteriza por la transferencia de las unidades de luz liberada (URL) medidas durante 0,5 s frente a la concentración en nM de las construcciones del trímero 4-1BBL dividido sometido a prueba. Las URL se emiten debido a la oxidación mediada por luciferasa de luciferina a oxiluciferina.

La **figura 17** muestra la expresión y actividad de luciferasa inducida por activación de NF κB medida con el ensayo descrito en el ejemplo 6.1. Los recuentos de luz liberada por segundo (CPS) se miden para 0,5 s/pocillo y se trazan frente a la concentración usada de construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP. Se incubaron células indicadoras HeLa humanas que expresan 4-1BB durante 6 horas en ausencia (**figura 17A**) o presencia de reticulación de la línea celular de melanoma humano que expresa FAP humana MV-3 (**figura 17B**) o WM-266-4 (**figura 17C**). Los CPS se midieron y se transfirieron frente a las concentraciones de diferentes construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP. La proporción celular es de una célula indicadora HeLa que expresa 4-1BB humano por cinco células tumorales. Para una mejor visualización, las curvas de activación se dividieron en cuatro transferencias de visualización diferentes con la construcción 1.1 ((kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido a FAP monovalente) y control B ((kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido no dirigido monovalente con cruce de CH-CL y residuos cargados) como curvas de comparación. La **figura 17A** muestra la activación sin reticular de células tumorales que expresan FAP, la **figura 17B** muestra la activación en presencia de células tumorales MV-3 que expresan FAP con reticulación y la **figura 17C** muestra la activación en presencia de reticulación de células tumorales WM-266-4 que expresan FAP.

La **figura 18** muestra la expresión y actividad de luciferasa inducida por activación de NF κB como se mide para las construcciones del ejemplo 2. Las unidades de luz liberada (URL) se miden para 0,5 s/pocillo y se trazan frente a la concentración usada de construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP. Se incubaron células indicadoras HeLa humanas que expresan 4-1BB durante 6 horas en ausencia o presencia de reticulación de la línea celular de melanoma humano que expresa FAP humana MV-3 o WM-266-4. Las URL se midieron y transfirieron frente a las concentraciones de diferentes construcciones 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6 (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP y los controles B, C, E y F. La proporción celular es de una célula indicadora HeLa que expresa 4-1BB por cinco células tumorales. Para una mejor visualización, las curvas de activación se dividieron en dos transferencias de visualización diferentes con la construcción 2.1 ((kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido a FAP monovalente).

En la **figura 19** se muestra el ensayo de activación establecido con la línea celular indicadora T293-HEK que expresa 4-1BB de macaco cangrejero. Una reticulación de 4-1BB de macaco cangrejero expresado en las células indicadoras induce la activación de NF κB y la expresión de luciferasa mediada por NF κB. Después de la lisis de las células, la luciferasa puede catalizar la oxidación de luciferina a oxiluciferina. Esta reacción química se correlaciona positivamente con la fuerza de la expresión de luciferasa mediada por NκB y se puede medir por la fuerza de

emisión de luz (unidades de luz liberada).

La **figura 20** muestra la expresión y actividad de luciferasa inducida por activación de NFκB. Las unidades de luz liberada (URL) se miden para 0,5 s/pocillo y se trazan frente a la concentración usada de construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP. Se incubaron células indicadoras T293-HEK que expresan 4-1BB de macaco cangrejero durante 6 horas en ausencia o presencia de reticulación de la línea celular de melanoma humano que expresa FAP humana MV-3 o WM-266-4. Las URL se midieron y se transfirieron frente a las concentraciones de diferentes construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP. La proporción celular es de una célula indicadora T293-HEK que expresa 4-1BB por cinco células MV-3 o dos células WM-266-4. Para una mejor visualización, las curvas de activación se dividieron en dos transferencias diferentes con la construcción 2.1 como curva de comparación.

Figura 21: Este esquema ilustra el principio del ensayo de activación de linfocitos T descrito en el ejemplo 6.3. Se muestra el esquema de activación del ensayo configurado con linfocitos T CD8 específico de HLA-A2-NLV y la línea celular de melanoma humano HLA-A2+FAP+ pulsado con NLV MV-3 en presencia de diferentes concentraciones tituladas de construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP. Las células se incubaron durante 28 horas, las últimas 4 horas en presencia de Golgi-Stop que contiene monesina. La proporción de linfocitos T CD8 específicos de NLV con respecto a células tumorales MV-3 es de 1:8.

Las **figuras 22A-E** y **23A-E** se refieren al ensayo de activación con linfocitos T CD8 específicos de HLA-A2-NLV y la línea celular MV-3 de melanoma humano HLA-A2+FAP+ pulsado por NLV en presencia de diferentes concentraciones tituladas de diferentes construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP como se prepara en el ejemplo 1. Para una mejor visualización, las curvas de expresión se dividieron en varias transferencias de visualización diferentes con construcción 1.1 ((kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido a FAP monovalente) y control B ((kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido no dirigido monovalente) como curvas de comparación. Los resultados se obtuvieron en cuatro experimentos similares independientes y muestran que la secreción prolongada de IFNγ y la expresión de CD137 de linfocitos T CD8+ específicos de NLV dependen estrictamente de la activación simultánea de los linfocitos T por medio del reconocimiento de los complejos NLV-HLA-A2 (señal 1) y la activación de 4-1BB mediante 4-1BBL dividido humano dirigido a FAP (señal 2). El efecto de la regulación por incremento de 4-1BB se muestra en los gráficos de la figura 22, mientras que el efecto de la expresión de INFγ de los linfocitos T CD8+ se presenta en los gráficos de la figura 23. Siempre se muestra la frecuencia en porcentaje de células positivas en la población total de linfocitos T CD8+. Todas las variantes dirigidas a FAP indujeron una mejora de activación similar de los linfocitos T CD8 activados con péptido NLV que se muestran en la figura 22 como regulación por incremento de 4-1BB (bucle de retroalimentación positiva) y en la figura 23 como expresión de IFNγ después de 24 horas de estimulación. Las diferencias de curvas se encuentran en el rango de desviación del error normal y no son significativas.

Las **figuras 24** y **25** se refieren al ensayo de activación con linfocitos T CD8 específicos de HLA-A2-NLV y la línea celular MV-3 de melanoma humano HLA-A2+FAP+ pulsado por NLV en presencia de concentración titulada de diferentes construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP del ejemplo 2. Para una mejor visualización, las curvas de expresión se dividieron en dos transferencias de visualización diferentes con la construcción 2.1 ((kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido a FAP monovalente) y el control B como curvas de comparación. Todas las construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido a FAP muestran una mejora de activación similar de los linfocitos T CD8 específicos del péptido HLA-A2-NLV que se muestran en la figura 24 como regulación por incremento de 4-1BB (bucle de retroalimentación positiva) y en la figura 25 como expresión de IFNγdespués de 24 horas de estimulación. Las diferencias de curvas se encuentran en el rango de desviación del error normal y no son significativas.

Figura 26: Este esquema ilustra el experimento descrito en el ejemplo 6.4.

La **figura 27** muestra la inducción de la proliferación de linfocitos T CD8+. Se muestra la frecuencia de proliferación de linfocitos T CD8+ frente a la concentración de construcciones sometidas a prueba.

La **figura 28A** se refiere al experimento de PK de dosis única de la construcción 1.2 y el control B en ratones NOG sanos. Se muestra la disminución de la concentración de construcción a lo largo del tiempo. La **figura 28B** muestra los resultados del experimento de PK de dosis única de las construcciones 2.1, 2.3, del control B y del control C en ratones NOG que portan tumores humanizados con células madre. La figura 28C se refiere al experimento de PK de dosis única que compara la construcción 2.1 y 2.3 en ratones NOG sanos.

La **figura 29** muestra componentes para el ensamblaje de ligandos 4-1BB humanos triméricos divididos. La figura (29A) muestra el ligando dimérico que se fusiona en el extremo C con un dominio CL humano con mutaciones E123R y Q124K (residuos cargados) y la figura (29B) muestra el ligando 4-1BB monomérico fusionado con el dominio CH1 humano con mutaciones K147E y K213E (residuos cargados). Componentes para el ensamblaje de la molécula de unión a antígeno del ligando 4-1BB (71-254) humano trimérico dividido dirigido a CD19 bivalente (construcción 3.3). La figura (29C) muestra el ligando dimérico que se fusiona con el extremo C de la cadena de ojal

Fc de IgG1 humana. La figura (29D) muestra el ligando monomérico que se fusiona con el extremo C de la cadena de botón Fc de IgG1 humana.

La **figura 30** muestra las construcciones 3.1 a 3.6 de la invención de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero 4-1BBL dirigido a CD19. La preparación y producción de estas construcciones se describe en el ejemplo 3. Los dominios VH y VL son los del anticuerpo anti-CD19 8B8-018, 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).

En la **figura 31A** se ilustra la estrategia de aleatorización para las regiones CDR del clon original 8B8. Se muestran los dominios variables del clon original 8B8 y las regiones CDR (encuadradas) de acuerdo con la numeración de Kabat. (X) representa las posiciones aleatorizadas. La **figura 31B** muestra la descripción esquemática de las estrategias de generación de colecciones. Se muestra la estrategia de clonación y amplificación por PCR usada para la generación de la colección basado en 8B8 con A) regiones CDR1 y CDR2 aleatorizadas en la cadena ligera y pesada o B) regiones CDR1 y CDR3 aleatorizadas en la región ligera y CDR3 en la cadena pesada. Se indican las enzimas respectivas usadas para la clonación en la fagemida.

La **figura 32** muestra la alineación del clon 8B8 anti-CD19 original con los aglutinantes maduros por afinidad seleccionados. Se muestran las secuencias del clon 8B8 y todos los aglutinantes maduros por afinidad seleccionados. Se enmarcan las CDR de cadenas pesadas y ligeras.

La **figura 33** se refiere al análisis por SPR del clon 8B8 original y sus variantes maduradas por afinidad. Se muestran los sensogramas del clon 8B8 y sus derivados madurados por afinidad que están desprovistos de los puntos calientes LCDR1 N27d y N28.

La **figura 34** ilustra la configuración del ensayo que mide la unión simultánea de la división trimérica de 4-1BBL dirigida a CD19 con 4-1BB hu y CD19 hu (ejemplo 8.2).

Los gráficos de la **figura 35** muestran la unión simultánea de las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 y 4.4 (analito 1) de las moléculas de unión a antígeno de fusión FC de 4-1BBL trimérico dirigido a CD19 con 4-1BB humano inmovilizado y CD19 humano (analito 2).

La **figura 36** muestra la unión de diferentes construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a CD19 con linfocitos T CD4 y CD8 que expresan 4-1BB de PHA-L y proleucina preactivada y PBMC humanas reactivadas anti-CD3 humana/anti-CD28 humana. La unión se detectó con un fragmento F(ab')2 de IgG caprino específico de Fγ de anti -IgG humana conjugado con R-ficoeritrina-fluorocromo. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) frente a la concentración de construcciones sometidas a prueba. Para una mejor visualización, las curvas de unión se dividen en tres transferencias diferentes con la construcción 3.4 y el control F (control de isotipo huIgG1 P329G LALA) como curvas de comparación. La unión se controló en linfocitos T CD45+ CD3+ CD8+ (figura 36A) y linfocitos T CD45+ CD3+ CD4+ (figura 36B). El nivel de expresión de 4-1BB en los linfocitos T CD8 es normalmente más alto que en los linfocitos T CD4. Todas las construcciones se unen con una afinidad bastante similar al 4-1BB humano.

La **figura 37** muestra la unión de moléculas de unión a antígeno (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a CD19 a líneas celulares de linfoma de linfocitos B que expresan CD19 humano: linfoma difuso de linfocitos B no Hodgkin grandes SU-DHL-8 (37A), leucemia linfoide aguda precursora de linfocitos B Nalm6 (37B), linfoma difuso de linfoblastos de células grandes Toledo (37C) y linfoma difuso de linfocitos B grandes OCI-Ly18 (37D). La unión se detectó con fragmentos F(ab')2 de IgG caprinos específicos de Fγ de anti-IgG humana conjugados con R-ficoeritrina-fluorocromo. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) frente a la concentración de construcciones sometidas a prueba. Para una mejor visualización, las curvas de unión se dividen en tres transferencias diferentes con la construcción 3.4 y el control F (control de isotipo huIgG1 P329G LALA) como curvas de comparación. Todas las construcciones se unen con una afinidad bastante similar al CD19 humano.

La **figura 38** se refiere a la expresión y actividad de luciferasa inducida por activación de NFκB de moléculas de unión a antígeno (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a CD19. Las unidades de luz liberada (URL) se miden para 0,5 s/pocillo y se trazan frente a la concentración usada de construcciones 3.1 y 3.3 de (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido dirigido o no dirigido a CD19 y moléculas de control B y C. Se incubaron células indicadoras HeLa que expresan 4-1BB humano durante 7,5 horas en ausencia o presencia de células SU-DHL-8 o de Pfeiffer que expresan CD19 humano reticulante. Las URL se midieron y se transfirieron frente a las concentraciones de diferentes construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a CD19. La proporción celular es de una célula indicadora HeLa que expresa 4-1BB por 2,5 o cinco células tumorales.

La **figura 39** muestra la unión de diferentes variantes humanizadas de IgG T84.66 en células de adenocarcinoma gástrico humano que expresan CEA. En base a los datos, se seleccionó la variante humanizada 1 para incluirla en

moléculas de unión a antígeno (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dirigido a CEA.

La **figura 40** muestra las construcciones 5.1 a 5.6 de la invención de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero 4-1BBL dirigido a CEA. La preparación y producción de estas construcciones se describe en el ejemplo 11. Los dominios VH y VL son los del anticuerpo anti-CEA T84.66-LCHA, 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 41A** muestra una descripción esquemática de NA3B3A2-avi His humano, el antígeno usado para evaluar la unión de moléculas de unión a antígeno (kih) de Fc 4-1BBL dividido trimérico dirigido a CEA. La **figura 41B** ilustra la configuración del ensayo que mide la unión simultánea del 4-1BBL dividido trimérico dirigido a CEA a 4-1BB hu y NA3B3A2 humano (ejemplo 12.1).

Los gráficos de la **figura 42** muestran la unión simultánea de las construcciones 5.4, 5.6, 5.7 y 5.8 (analito 1) de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc de 4-1BBL trimérico dirigido a CEA al 4-1BB humano inmovilizado y NA3B3A2 humano (analito 2).

En la **figura 43** se muestra la unión de diferentes construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a CEA a linfocitos T CD4 y CD8 que expresan 4-1BB de PHA-L y proleucina preactivada y PBMC humanas reactivadas anti-CD3 humana/anti-CD28 humana. La unión se detectó con un fragmento F(ab')2 de IgG caprino específico de Fcγ de anti-IgG humana conjugado con R-ficoeritrina-fluorocromo. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) frente a la concentración de construcciones sometidas a prueba. Para una mejor visualización, las curvas de unión se dividen en dos transferencias diferentes con la construcción 5.4 y el control F (control de isotipo huIgG1 P329G LALA) como curvas de comparación. La unión se supervisó en linfocitos T CD45+ CD3+ CD8+ (transferencias en la parte inferior) y linfocitos T CD45+ CD3+ CD4+ (transferencias en la parte superior). El nivel de expresión de 4-1BB en los linfocitos T CD8 es normalmente más alto que en los linfocitos T CD4. Todas las construcciones se unen con una afinidad bastante similar al 4-1BB humano.

La **figura 44** muestra la unión de construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a CEA a la línea celular gástrica humana MKN-45 (izquierda) que expresa CEA humano y la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano LS180 (derecha). La unión se detectó con fragmentos F(ab')2 de IgG caprinos específicos de Fγc de anti -IgG humana conjugados con R-ficoeritrina-fluorocromo. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) frente a la concentración de construcciones sometidas a prueba.

La **figura 45** se refiere a la expresión y actividad de luciferasa inducida por activación de NFκB de moléculas de unión a antígeno (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a CEA. Las unidades de luz liberada (URL) se miden para 0,5 s/pocillo y se trazan frente a la concentración usada de construcciones 5.4, 5.6, 5.7 y 5.8 (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a CEA y moléculas de control. Se incubaron células indicadoras HeLa humanas que expresan 4-1BB humano durante 6 horas en ausencia o presencia de la línea celular cancerosa gástrica humana que expresa CEA humano reticulante MKN-45. La proporción celular es de una célula indicadora HeLa que expresa 4-1BB por tres células tumorales.

En las **figuras 46A y 46B** se muestran los componentes para el ensamblaje del ligando OX40 humano trimérico dividido dirigido a FAP monovalente (construcción 6.1). La figura 46A se refiere al ligando dimérico fusionado con el dominio IgG1-CL humano; la figura 46B se refiere al ligando monomérico fusionado con el dominio IgG1-CH1 humano. La **figura 46C** muestra la construcción 6.1 de la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero OX40L dirigido a FAP. En la **figura 46D** se muestra la IgG1 PGLALA humana "no dirigida" a DP47 (control F).

La **figura 47A** muestra la unión de Ox40L humano trimérico dividido dirigido a FAP a células WM-266-4 positivas para FAP. Las células WM-266-4 expresan niveles elevados de proteína de activación de fibroblastos humanos (huFAP). Solo las construcciones (kih) de Fc ligando de OX40 dirigidas a FAP (cuadrado relleno) pero no el control 5 (rombo relleno) se enlazan a las células WM-266-4. Se muestra la unión como mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) del fragmento F(ab')2 de IgG caprino específico de Fγc de anti -IgG humana marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), el cual se usa como anticuerpo de detección secundaria. La MFI se midió mediante citometría de flujo. El eje x muestra la concentración de construcciones de anticuerpo.La **figura 47B** muestra la unión de la construcción (kih) de Fc ligando de OX4O dirigido a FAP a glóbulos rojos A549 NucLight negativas para OX40 humano de FAP humana. La construcción (kih) de Fc ligando de Ox40 dirigido a FAP no mostró unión a células tumorales A549 negativas para FAP negativas para Ox40. Se muestra la unión como mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) del fragmento F(ab')2 de IgG caprino específico de Fc γ de anti-IgG humana marcado con FITC, el cual se usa como anticuerpo de detección secundaria. La MFI se midió mediante citometría de flujo y el valor de referencia se corrigió restando la MFI del control en blanco.

En la **figura 48A** se muestra la unión de FAP-Ox40L a linfocitos T CD4 humanos en reposo y activados. Ox40 no se expresa en linfocitos T CD4 humanos en reposo (lado izquierdo). En ausencia de células que expresan Ox40 humanas, no se observó unión (gráficos de la izquierda). Después de la activación de las PBMC humanas, Ox40 se

regula por incremento en linfocitos T CD4+ (lado derecho). FAP-Ox40L se unió a linfocitos T CD4 activados Ox40+. Se muestra la unión como mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) del fragmento F(ab')2 de IgG caprino específico de Fcγ de anti-IgG humana marcado con FITC, el cual se usa como anticuerpo de detección secundaria. La MFI se midió mediante citometría de flujo y el valor de referencia se corrigió restando la MFI del control en blanco. El eje x muestra la concentración de construcciones de anticuerpo. La **figura 48B** muestra que Ox40 no se expresa en linfocitos T CD8 humanos en reposo (lado izquierdo). En ausencia de células que expresan Ox40 humanas, no se observó unión (gráficos de la izquierda). Después de la activación de las PBMC humanas, Ox40 se regula por incremento en linfocitos T CD8+ (lado derecho). La expresión de Ox40 en linfocitos T CD8+ humanos es menor que en linfocitos T CD4+ y varía entre donantes y puntos temporales. La expresión de Ox40 fue baja en los linfocitos T CD8 representados. FAp-Ox40L se unió a linfocitos T CD8 activados Ox40+. Se muestra la unión como mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) del fragmento F(ab')2 de IgG caprino específico de Fc γ de anti-IgG humana marcado con FITC, el cual se usa como anticuerpo de detección secundaria. La MFI se midió mediante citometría de flujo y el valor de referencia se corrigió restando la MFI del control en blanco. El eje x muestra la concentración de construcciones de anticuerpo.

En la **figura 49** se demuestra la activación de la vía de señalización de NFκB por la molécula de unión a antígeno OX40L humano trimérico dividido dirigido a FAP (FAP-OX40L) en células indicadoras HeLa_hOx40_NFkB_Lucl. Se muestra la activación con (gráfico de la derecha) o sin (gráfico de la izquierda) reticulación por el anticuerpo secundario. Las células indicadoras se cultivaron durante 5 horas en presencia de FAP-OX40L a las concentraciones indicadas con o sin reticulación del fragmento F(ab)2 de IgG caprino específico de γ Fc anti-huIgG1 policlonal secundario en una proporción de 1:2. La actividad de luciferasa se evaluó como se describe en el ejemplo 6.1. La actividad se caracteriza por la transferencia de las unidades de luz liberada (URL) medidas durante 0,5 s frente a la concentración en nM de la construcción sometida a prueba. Las URL se emiten debido a la oxidación mediada por luciferasa de luciferina a oxiluciferina.

La activación de NFκB por FAP-OX40L en células indicadoras HeLa_hOx40_NFkB_Lucl en presencia de células positivas para FAP se muestra en la **figura 50A**. Se muestra la activación de la vía de señalización de NF κB en las células indicadoras por FAP-OX40L en presencia de células FAP humanas NIH-3T3 que expresan baja FAP (proporción de 3 células tumorales FAP+ por 1 célula indicadora). La actividad de luciferasa mediada por NF κB se caracterizó por la transferencia de las unidades de luz liberada (URL), medidas durante 0,5 s, frente a la concentración en nM de compuestos sometidos a prueba. Las URL se emiten debido a la oxidación mediada por luciferasa de luciferina a oxiluciferina. Los valores se corrigen según el valor de referencia restando las URL del control en blanco. Para una mejor comparación, se cuantificó el área bajo la curva de las respectivas curvas de dosis-respuesta transferidas como marcador de la capacidad agonista de cada construcción. La comparación se ilustra en la **figura 50B**. El área se calculó usando prisma GraphPad. Los valores se corrigen según el valor de referencia restando el valor del control en blanco.

La **figura 51** muestra la coestimulación mediada por OX40 de PBMC humanas en reposo desencadenadas por TCR de forma subóptima (ejemplo 15.5). La hiperreticulación de FAP-Ox40L por las células presentes del clon 39 de NIH/3T3-huFAP promovió fuertemente la supervivencia y la proliferación en los linfocitos T CD4 y CD8 humanos. Se muestra el recuento de acontecimientos de los linfocitos T CD4+ (izquierda) y CD8+ (derecha) vitales. Se restaron los valores de referencia de las muestras que contenían solo el anti-CD3 humano (clon V9, huIgG1), PBMC humanas en reposo y el clon 39 de NIH/3T3-huFAP. Por tanto, aquí se muestra el efecto potenciador de la coestimulación con OX40 pero no el efecto de la estimulación anti-CD3 subóptima per se. En las figuras de la parte inferior se muestra el rescate de la estimulación por TCR subóptima de PBMC humanas en reposo con la proliferación de FAP-Ox40L inmovilizada en la superficie celular.

Descripción detallada de la invención
Definiciones

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.

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 supercóntigos.

Como se usa en el presente documento, el término **"resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana"** se refiere a una molécula polipeptídica que se une específicamente a un determinante antigénico. En un aspecto, el resto de unión a antígeno puede activar la señalización a través de su antígeno de célula diana. En un aspecto particular, el resto de unión a antígeno puede dirigir la entidad a la que se une (por ejemplo, el trímero de ligando de la familia de TNF) a un sitio diana, por ejemplo a un tipo específico de célula tumoral o estroma

tumoral que porta el determinante antigénico. Los restos que se pueden unir específicamente a un antígeno de célula diana incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos como se define además en el presente documento. Además, los restos que se pueden unir específicamente a un antígeno de célula diana incluyen proteínas de unión a antígeno supercóntigo como se define además en el presente documento, por ejemplo, dominios de unión que se basan en proteínas repetidas diseñadas o dominios repetidos diseñados (véase, por ejemplo, el documento WO 2002/020565).

En relación con un anticuerpo o fragmento del mismo, el término "resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana" se refiere a la parte de la molécula que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria de parte o todo un antígeno. Se puede proporcionar un resto que se puede unir a un antígeno específico, por ejemplo, mediante uno o más dominios variables de anticuerpo (también denominados regiones variables de anticuerpo). En particular, un resto que se puede unir a un antígeno específico comprende una región variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo.

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.

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 surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades insignificantes. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos 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.

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 antigénicos distintos. Típicamente, una molécula de unión a antígeno biespecífica comprende dos sitios de unión a antígeno, de los que cada uno es específico para un determinante antigénico diferente. En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica se puede unir simultáneamente a dos determinantes antigénicos, en particular dos determinantes antigénicos expresados en dos células distintas.

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.

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 natural 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 dos cadenas pesadas que se unen mediante enlaces disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también llamados región constante de la cadena pesada. De forma similar, desde el extremo N al 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 constante de la cadena ligera (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, γ1 (IgG1), γ2 (IgG2), γ3 (IgG3), γ4 (IgG4), α1 (IgA1) y α2 (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.

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, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, págs. 269-315 (1994); véanse 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.

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.

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 $CrossFab_{(VLVH)}$. 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 $CrossFab_{(CLCH1)}$.

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: 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).

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).

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.

Las "**proteínas de unión a antígeno supercóntigo**" son conocidas en la técnica, por ejemplo, la fibronectina y las proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) se han usado como supercóntigos 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 proteína de unión a antígeno supercóntigo se selecciona del grupo que consiste en CTLA-4 (Evibody), 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 fibronectina (AdNectin), un dominio de lectina de tipo C (tetranectina); 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).

CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) es un receptor de la familia CD28 expresado principalmente en linfocitos T CD4+. Su dominio extracelular tiene un pliegue de Ig similar a un dominio variable. Los bucles correspondientes a las CDR de los anticuerpos se pueden sustituir por secuencias heterólogas para conferir diferentes propiedades de unión. Las moléculas de CTLA-4 diseñadas para tener diferentes especificidades de unión también se conocen como evicuerpos (por ejemplo, el documento US7166697B1). Los evicuerpos tienen aproximadamente el mismo tamaño que la región variable aislada de un anticuerpo (por ejemplo, un dominio de anticuerpo). Para obtener más detalles, véase Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001).

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.

Un affibody es un supercóntigo derivado de la proteína A de staphylococcus aureus que se puede genomanipular para unirse al antígeno. El dominio consiste en un paquete de tres hélices de aproximadamente 58 aminoácidos. Se han generado bancos mediante la aleatorización de residuos superficiales. Para obtener más detalles, véase Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004) y el documento EP 1641818A1.

Los avímeros son proteínas multidominio derivadas de la familia de supercóntigos de dominio A. Los dominios naturales de aproximadamente 35 aminoácidos adoptan una estructura definida con enlaces disulfuro. La diversidad se genera al mezclar la variación natural presentada por la familia de dominios A. Para obtener más detalles, véase Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005) y Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (junio de 2007).

Una transferrina es una glicoproteína transportadora de suero monomérica. Las transferrinas se pueden genomanipular para unirse a diferentes antígenos diana mediante la inserción de secuencias peptídicas en un bucle superficial permisivo. Ejemplos de supercóntigos de transferrina diseñados incluyen el cuerpo trans. Para más detalles, véase J. Biol. Chem. 274, 24066-24073 (1999).

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), PNAS100(4), 1700-1705 (2003) y J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) y el documento US20040132028A1.

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.

La fibronectina es un supercóntigo que se puede genomanipular para unirse al antígeno. Las adnectinas consisten en una columna vertebral de la secuencia de aminoácidos natural del décimo dominio de las 15 unidades repetidas de fibronectina humana tipo III (FN3). Se pueden genomanipular tres bucles en un extremo del sándwich beta para permitir que una adnectina reconozca específicamente una diana terapéutica de interés. Para obtener más detalles, véase Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005), el documento US20080139791, el documento WO2005056764 y el documento US6818418B1.

Los aptámeros peptídicos son moléculas de reconocimiento combinatorio que consisten en una proteína de supercóntigo constante, típicamente tiorredoxina (TrxA) que contiene un bucle peptídico variable restringido insertado en el sitio activo. Para obtener más detalles, véase Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005).

Los microcuerpos se derivan de microproteínas naturales de 25-50 aminoácidos de longitud que contienen 3-4 puentes de cisteína: los ejemplos de microproteínas incluyen KalataBI y conotoxinas y knottinas. Las microproteínas tienen un bucle que se puede genomanipular para incluir hasta 25 aminoácidos sin afectar el pliegue general de la microproteína. Para obtener más detalles sobre los dominios de knottina genomanipulados, véase el documento WO2008098796.

Una "**molécula de unión a antígeno que se une al mismo epítopo**" 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.

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).

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. Los determinantes antigénicos útiles se pueden encontrar, 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 J17, 323-329 (2000)), y ensayos de unión 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 (Kd) de ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM o ≤ 0,001 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 (Kd), que es la proporción de las constantes de velocidad de disociación y asociación (kdis y kas, 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 (RPS).

Un "**antígeno de célula diana**" como se usa en el presente documento se refiere a un determinante antigénico presentado en la superficie de una célula diana, por ejemplo una célula en un tumor tal como una célula cancerosa o una célula del estroma tumoral. En determinadas modos de realización, el antígeno de la célula diana es un antígeno en la superficie de una célula tumoral. En un modo de realización, el antígeno de célula diana se selecciona del grupo que consiste en proteína de activación de fibroblastos (FAP), antígeno carcinoembrionario (CEA), proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD19, CD20 y CD33. En particular, el antígeno de la célula diana es la proteína de activación de fibroblastos (FAP).

El término "**proteína de activación de fibroblastos (FAP)**", también conocido como FAP prolil endopeptidasa o Seprasa (EC 3.4.21), se refiere a cualquier FAP 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 la FAP no procesada "de longitud completa", así como cualquier forma de FAP que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de FAP, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno de la invención se puede unir específicamente a la FAP humana, de ratón y/o de macaco cangrejero. La secuencia de aminoácidos de FAP humana se muestra en UniProt (www.uniprot.org), n.º de acceso Q12884 (versión 149, SEQ ID NO: 20) o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2. El dominio extracelular (ECD) de la FAP humana se extiende desde la posición del aminoácido 26 hasta la 760. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de un ECD de FAP humana marcado con His se muestran en las SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de FAP de ratón se muestra en UniProt, n.º de acceso P97321 (versión 126, SEQ ID NO: 23) o NCBI RefSeq NP_032012.1. El dominio extracelular (ECD) de la FAP de ratón se extiende desde la posición del aminoácido 26 hasta la 761. Las SEQ ID NO: 24 y 25 muestran las secuencias de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente, de un ECD de FAP de ratón marcado con His. Las SEQ ID NO: 26 y 27 muestran las secuencias de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente, de un ECD de FAP de macaco cangrejero marcado con His. Preferentemente, una molécula de unión a anti-FAP de la invención se une al dominio extracelular de FAP. En la solicitud de patente internacional n.º WO 2012/020006 A2 se describen moléculas de unión a anti-FAP ejemplares.

El término **"antígeno carcinoembrionario (CEA)"**, también conocido como molécula 5 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM5), se refiere a cualquier CEA 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 CEA humano se muestra en UniProt, n.º de acceso P06731 (versión 151, SEQ ID NO: 28). El CEA se ha identificado durante mucho tiempo como un antígeno asociado a tumores (Gold and Freedman, J Exp Med., 121:439-462, 1965; Berinstein N. L., J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002). Originalmente clasificado como una proteína expresada solo en tejido fetal, el CEA ahora se ha identificado en varios tejidos adultos normales. Estos tejidos son principalmente de origen epitelial, incluidas las células del tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario, y las células del colon, cuello uterino, glándulas sudoríparas y próstata (Nap et al., Tumour Biol., 9(2-3): 145-53, 1988; Nap et al, Cancer Res., 52(8):2329-23339, 1992). Los tumores de origen epitelial, así como sus metástasis, contienen el CEA como un antígeno asociado a un tumor. Si bien la presencia de CEA por sí misma no indica la transformación a una célula cancerosa, la distribución del CEA es indicativa. En el tejido normal, el CEA se expresa en general en la superficie apical de la célula (Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9 (2): 67-81 (1999)), lo que lo hace inaccesible para los anticuerpos en el torrente sanguíneo. A diferencia del tejido normal, el CEA tiende a expresarse en toda la superficie de las células cancerosas (Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)). Este cambio en el patrón de expresión hace que el CEA sea accesible para la unión de anticuerpos en células cancerosas. Además, la expresión de CEA aumenta en células cancerosas. Además, la expresión incrementada de CEA promueve un aumento de las adhesiones intercelulares, que pueden dar lugar a metástasis (Marshall J., Semin Oncol., 30(a Suppl. 8):30-6, 2003). La prevalencia de expresión de CEA en diversas entidades tumorales es en general muy alta. En concordancia con los datos publicados, análisis propios realizados en muestras de tejido confirmaron su alta prevalencia, con aproximadamente el 95 % en carcinoma colorrectal (CCR), 90 % en cáncer de páncreas, 80 % en cáncer gástrico, 60 % en carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM, donde se coexpresa con HER3), y 40 % en cáncer de mama; se descubrió una baja expresión en el carcinoma de pulmón microcítico y en el glioblastoma.

El CEA se escinde fácilmente de la superficie de la célula y se disemina al torrente sanguíneo desde los tumores, directamente o a través del sistema linfático. Debido a esta propiedad, el nivel de CEA en suero se ha utilizado como un marcador clínico para el diagnóstico de cánceres y las pruebas de detección de la recurrencia de cánceres, en particular el cáncer colorrectal (Goldenberg D M., The International Journal of Biological Markers, 7:183-188, 1992; Chau I., et al., J Clin Oncol., 22:1420-1429, 2004; Flamini et al., Clin Cancer Res; 12(23):6985-6988, 2006).

El término "**proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP)**", también conocido como proteoglucano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), se refiere a cualquier MCSP 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 MCSP humano se muestra en UniProt, n.º de acceso Q6UVK1 (versión 103, SEQ ID NO: 29). El término "**receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)**", también denominado protooncogén c-ErbB-1 o receptor de tirosina-proteína quinasa erbB-1, se refiere a cualquier EGFR natural de cualquier fuente de vertebrados, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos) primates no humanos (por ejemplo, monos cangrejeros) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. La secuencia de aminoácidos del EGFR humano se muestra en UniProt, n.º de acceso P00533 (versión 211, SEQ ID NO: 30).

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 Uniprot P15391 (versión 160, SEQ ID NO: 31). 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 al mismo. 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 miembro 1 de la subfamilia A de 4 dominios que abarcan membrana (MS4A1), 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 Uniprot P11836 (versión 149, SEQ ID NO: 32). "**CD33**" se refiere al antígeno de superficie celular mieloide CD33, también conocido como SIGLEC3 o gp67, e incluye cualquier CD33 natural de cualquier fuente de vertebrados, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos), primates no humanos (por ejemplo, monos cangrejeros) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. La secuencia de aminoácidos del CD33 humano se muestra en el n.º de acceso Uniprot P20138 (versión 157, SEQ ID NO: 33).

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 dominio VH o VL único puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno.

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 hipervariable y/o forman bucles definidos estructuralmente ("bucles hipervariables"). 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 antigénico. 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 residuos de aminoácido superpuestos o subconjuntos de los mismos 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 A 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 qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

TABLA A. Definiciones de CDR [1]

CDR	Kabat	Chothia	AbM[2]
CDR1 V_H	31-35	26-32	26-35
CDR2 V_H	50-65	52-58	50-58
CDR3 V_H	95-102	95-102	95-102
CDR1 V_L	24-34	26-32	24-34
CDR2 V_L	50-56	50-52	50-56
CDR3 V_L	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).

[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.

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 aminoacídicos específicas en una región variable de anticuerpo son de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden en general los residuos aminoacídicos 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 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*.

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 de unión a antígeno de referencia. La maduración de la afinidad en general implica la modificación de uno o más residuos de aminoácidos 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.

"**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.

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 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 de aminoácidos 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.

El término anticuerpo "**quimérico**" 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, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.

Un anticuerpo "**humanizado"** se refiere a un anticuerpo quimérico 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 con respecto 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 de un residuo aminoacídico aproximadamente en la posición 231 a un residuo aminoacídico aproximadamente en la posición 340. En un modo de realización, una cadena de carbohidratos 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 a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, de un residuo aminoacídico aproximadamente en la posición 341 a un residuo aminoacídico 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 carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de residuos aminoacídicos en la región Fc o región constante es 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 de Health, Bethesda, MD, 1991.

La tecnología de "**botón en ojal**" se describe, por ejemplo, en los documentos US5.731.168; US7.695.936; 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 peptídica. 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 de aminoácidos 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)). La numeración es de acuerdo con el índice EU de Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5.ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

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 deleciones 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 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 Fc activador particular es FcγRIIIa humano (véase el n.° de acceso UniProt P08637, versión 141).

El término "**miembro de la familia de ligandos de TNF**" o "ligando de la familia de TNF" se refiere a una citocina proinflamatoria. Las citocinas en general, y en particular los miembros de la familia de ligandos de TNF, juegan un papel crucial en la estimulación y coordinación del sistema inmunitario. En la actualidad, se han identificado diecinueve citocinas como miembros de la superfamilia de ligandos de TNF (factor de necrosis tumoral) sobre la base de similitudes de secuencia, funcionales y estructurales. Todos estos ligandos son proteínas transmembrana de tipo II con un dominio extracelular C terminal (ectodominio), un dominio intracelular N terminal y un dominio transmembrana único. El dominio extracelular C terminal, conocido como dominio de homología de TNF (THD), tiene una identidad de aminoácidos del 20-30 % entre miembros de la superfamilia y es responsable de la unión al receptor. El ectodominio de TNF también es responsable de que los ligandos de TNF formen complejos triméricos que son reconocidos por sus receptores específicos.

Los miembros de la familia de ligandos de TNF se seleccionan del grupo que consiste en linfotoxina α (también conocida como LTA o TNFSF1), TNF (también conocido como TNFSF2), LTβ(también conocido como TNFSF3), OX40L (también conocido como TNFSF4), CD40L (también conocido como CD154 o TNFSF5), FasL (también conocido como CD95L, CD178 o TNFSF6), CD27L (también conocido como CD70 o TNFSF7), CD30L (también conocido como CD153 o TNFSF8), 4-1BBL (también conocido como TNFSF9), TRAIL (también conocido como APO2L, CD253 o TNFSF10), RANKL (también conocido como CD254 o TNFSF11), TWEAK (también conocido como TNFSF12), APRIL (también conocido como CD256 o TNFSF13), BAFF (también conocido como CD257 o TNFSF13B), LIGHT (también conocido como CD258 o TNFSF14), TL1A (también conocido como VEGI o TNFSF15), GITRL (también conocido como TNFSF18), EDA-A1 (también conocido como ectodisplasina A1) y EDA-A2 (también conocido como ectodisplasina A2). El término se refiere a cualquier ligando de la familia de TNF 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. En modos de realización específicos de la invención, el miembro de la familia de ligandos de TNF se selecciona del grupo que consiste en OX40L, FasL, CD27L, TRAIL, 4-1BBL, CD40L y GITRL. En un modo de realización particular, el miembro de la familia de ligandos de TNF se selecciona de entre 4-1BBL y OX40L.

Se puede obtener más información, en particular secuencias, de los miembros de la familia de ligandos de TNF de bases de datos de acceso público tales como Uniprot (www.uniprot.org). Por ejemplo, los ligandos de TNF humanos tienen las siguientes secuencias de aminoácidos: linfotoxina α humana (n.º de acceso de UniProt P01374, SEQ ID NO: 34), TNF humano (n.º de acceso de UniProt P01375, SEQ ID NO: 35), linfotoxina β humana (n.º de acceso de UniProt Q06643, SEQ ID NO: 36), OX40L humano (n.º de acceso de UniProt P23510, SEQ ID NO: 37), CD40L humano (n.º de acceso de UniProt P29965, SEQ ID NO: 38), FasL humano (n.º de acceso de UniProt P48023, SEQ ID NO: 39), CD27L humano (n.º de acceso de UniProt P32970, SEQ ID NO: 40), CD30L humano (n.º de acceso de UniProt P32971, SEQ ID NO: 41), 4-1BBL (n.º de acceso de UniProt P41273, SEQ ID

NO: 42), TRAIL (n.º de acceso de UniProt P50591, SEQ ID NO: 43), RANKL (n.º de acceso de UniProt O14788, SEQ ID NO: 44), TWEAK (n.º de acceso de UniProt O43508, SEQ ID NO: 45), ABRIL (n.º de acceso de UniProt O75888, SEQ ID NO: 46), BAFF (n.º de acceso de UniProt Q9Y275, SEQ ID NO: 47), LIGHT (n.º de acceso de UniProt O43557, SEQ ID NO: 48), TL1A (n.º de acceso de UniProt O95150, SEQ ID NO: 49), GITRL (n.º de acceso de UniProt Q9 UNG2, SEQ ID NO: 50) y ectodisplasina A (n.º de acceso de UniProt. Q92838, SEC ID NO: 51).

Un "**ectodominio**" 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 ectodominio del miembro de la familia de ligandos de TNF, como se define en el presente documento, se refiere por tanto a la parte de la proteína del ligando de TNF 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 de TNF. El término "ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo" se refiere por tanto al dominio extracelular del miembro de la familia de ligandos de TNF que forma el dominio extracelular o a partes del mismo que todavía se pueden unir al receptor (dominio de unión al receptor).

El término "**miembro de la familia de ligandos de TNF coestimuladores**" o "ligando de la familia de TNF coestimulador" se refiere a un subgrupo de miembros de la familia de ligandos de TNF, que son capaces de coestimular la proliferación y la producción de citocinas de linfocitos T. Los ligandos de la familia de TNF pueden coestimular las señales de TCR al interactuar con sus receptores de TNF correspondientes; y la interacción con sus receptores da lugar al reclutamiento de factores asociados a TNFR (TRAF), que inician cascadas de señalización que dan como resultado la activación de linfocitos T. Los ligandos de la familia de TNF coestimuladores se seleccionan del grupo que consiste en 4-1BBL, OX40L, GITRL, CD70, CD30L y LIGHT, más en particular, el miembro de la familia de ligandos de TNF coestimuladores se selecciona de entre 4-1BBL y OX40L.

Como se describe anteriormente en el presente documento, 4-1BBL es una proteína transmembrana de tipo II y un miembro de la familia de ligandos de TNF. Se ha descrito que el 4-1BBL de longitud completa o total que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 forma trímeros en la superficie de las células. La formación de trímeros está habilitada por motivos específicos del ectodominio 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: 52) 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 "ectodominio 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) y SEQ ID NO: 2 (aminoácidos 85-254 de 4-1BBL humano) o polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 96 (aminoácidos 71-248 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 375 (aminoácidos 52-248 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 374 (aminoácidos 80-248 de 4-1BBL humano) y SEQ ID NO: 373 (aminoácidos 85-248 de 4-1BBL humano), pero también se incluyen en el presente documento otros fragmentos del ectodominio que se pueden trimerizar.

Como se describe anteriormente en el presente documento, OX40L es otra proteína transmembrana de tipo II y otro miembro de la familia de ligandos de TNF. El OX40L humano completo o de longitud completa tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. Los aminoácidos 51-183 de la secuencia de OX40L humano (SEQ ID NO: 53) forman el dominio extracelular de OX40L, pero incluso fragmentos del mismo pueden formar los trímeros. En modos de realización específicos de la invención, el término "ectodominio de OX40L o un fragmento del mismo" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 53 (aminoácidos 51-183 de OX40L humano) o SEQ ID NO: 54 (aminoácidos 52-183 de OX40L humano), pero también se incluyen en el presente documento otros fragmentos del ectodominio que se pueden trimerizar.

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 1 y 4, en particular 2; es decir, los péptidos seleccionados del grupo que consiste en GGGGS (SEQ ID NO: 128), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13), SGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 55) y GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 56), pero también incluye las secuencias GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 57), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 58), GSGSGNGS (SEQ ID NO: 59), GGSGSGSG (SEQ ID NO: 60), GGSGSG (SEQ ID NO: 61), GGSG (SEQ ID NO: 62), GGSGNGSG (SEQ ID NO: 63), GGNGSGSG (SEQ ID NO: 64) y GGNGSG (SEQ ID NO: 65). Los conectores peptídicos de particular interés son $(G4S)_1$ o GGGGS (SEQ ID NO: 128), $(G_4S)_2$ o GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13) y GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 57), más en particular $(G_4S)_2$ o GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13) y GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 57).

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).

Una "**proteína de fusión monocatenaria**", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido monocatenario compuesto por uno o dos ectodominios de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF fusionado con una parte del resto de unión a antígeno o parte Fc. La fusión se puede producir uniendo directamente el aminoácido N o C terminal del resto de unión a antígeno por medio de un conector peptídico al aminoácido C o N terminal del ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF.

Por "fusionados" o "conectados" se quiere decir que los componentes (por ejemplo, un polipéptido y un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF) están unidos por enlaces peptídicos, ya sea directamente o por medio de uno o más conectores peptídicos.

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 de ordenador 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 está 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, 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 de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos aminoacídicos 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 aminoacídicos 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 indique 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 que contienen trímero de ligando de TNF 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 que contienen trímero de ligando de TNF. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica las moléculas o por síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, 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 B 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 B

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 supondrán 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 basadasen presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, uno o más residuos de HVR mutan y las moléculas de unión a antígeno variables se muestran en el fago y se criban para una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión). En determinados modos de realización se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad de la molécula de unión a antígeno de unirse al antígeno. Por ejemplo, en las HVR se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona 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 aminoacídica incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos aminoacídicos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF 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 que contienen trímero de ligando de TNF.

En determinados modos de realización, las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF 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 eliminen uno o más sitios de glucosilación. Cuando la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de TNF 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 la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF para crear variantes con determinadas propiedades mejoradas. En un aspecto, se proporcionan variantes de moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF 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 US2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Otras variantes de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF 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.).

En determinados modos de realización puede ser deseable crear **variantes genomanipuladas con cisteína** de la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, por ejemplo, "tioMAb", en las 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 inmunoconjugado. En determinados modos de realización se puede sustituir uno cualquiera o más de los siguientes residuos con cisteína: 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 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 que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF 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 hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(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 propropilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxietilados (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. USA102 (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 inmunoconjugados de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF proporcionadas en el presente documento. Un "**inmunoconjugado**" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterógenas, 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 cualquiera de uno 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 contienen normalmente 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 tiene una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia se puede delecionar o sustituir con otro nucleótido, o un número de nucleótidos hasta un 5 % de los nucleótidos totales en 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 residuos en 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 particular 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.

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 se codifica 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.

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 primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. 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 anfitrionas incluyen células cultivadas, p. ej., 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.

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.

Una "**cantidad terapéuticamente eficaz**" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos 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.

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

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.

Un "**excipiente 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.

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.

El término "**cáncer**" como se usa en el presente documento se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de pulmón de tipo bronquioloalveolar, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR), cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma endometrial, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgking, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de partes blandas, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar,

neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores de la médula espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwanomas, ependimonas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma hipofisario y sarcoma de Ewing, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de linfocitos B (linfoma), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crónica, incluyendo versiones resistentes al tratamiento de cualquiera de los cánceres anteriores o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

Moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF

La divulgación proporciona moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF novedosas con propiedades particularmente ventajosas tales como producibilidad, estabilidad, afinidad de unión, actividad biológica, eficacia de direccionamiento y toxicidad reducida.

En un primer aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana y

(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 TNF 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 dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana,

(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 TNF 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 dicho miembro de la familia de ligandos de TNF 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 un aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende (a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro, en la 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 TNF 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 TNF o un fragmento del mismo, en el que el miembro de la familia de ligandos de TNF coestimula la activación del linfocito T humano.

En otro aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende (a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana y

(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 TNF 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 dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, en el que los ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF son idénticos en todos los casos.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana 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

(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 un miembro de la familia de ligandos de TNF 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 dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o

(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 un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí y al extremo C del dominio CH3 mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico al extremo C del dominio CH3 de dicho polipéptido, o

(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 un miembro de la familia de ligandos de TNF 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 dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico a VL o VH de dicho polipéptido.

En un aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende un miembro de la familia de ligandos de TNF que coestimula la activación de linfocitos T humanos que se selecciona de entre 4-1BBL y OX40L. Más en particular, el miembro de la familia de ligandos de TNF es 4-1BBL.

En otro aspecto, el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375, en particular la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 96. En un aspecto, el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo comprende la 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 y SEQ ID NO: 96, en particular la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 96. En un aspecto particular, el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmento del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana 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: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99; 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: 96, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. En un aspecto particular, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

En un aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana y

(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 de SEQ ID NO: 5 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana y

(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 de SEQ ID NO: 5 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 183.

Aún en otro aspecto, la molécula de unión Aún a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF

comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana y

(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 de SEQ ID NO: 97 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 184 o SEQ ID NO: 185.

En otro aspecto, el miembro de la familia de ligandos de TNF es OX40L. En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54, en particular la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53.

En un aspecto, la divulgación se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana y

(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 de SEQ ID NO: 371 o SEQ ID NO: 372 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54, respectivamente.

En un aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana,

(b) un primer polipéptido que contiene un dominio CH1 o CL y un segundo polipéptido que contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en el que el segundo polipéptido se une al primer polipéptido por un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,

y 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 TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana,

(b) un primer polipéptido que contiene un dominio CH1 y un segundo polipéptido que contiene un dominio CL, en el que el segundo polipéptido se une al primer polipéptido por un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,

y 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 TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CH1 mediante un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico al dominio CL de dicho polipéptido.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana,

(b) un primer polipéptido que contiene un dominio CL y un segundo polipéptido que contiene un dominio CH1, en el que el segundo polipéptido se une al primer polipéptido por un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,

y 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 TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CL mediante un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico al dominio CH1 de dicho polipéptido.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana y

(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 TNF 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 dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

Aún en otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) más de un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana y

(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 TNF 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 dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico a dicho polipéptido.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) dos restos que se pueden unir específicamente a un antígeno de célula diana y

(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 TNF 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 dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana, y

(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 contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en el que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí y al extremo C del dominio CH3 mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico al extremo C del dominio CH3 de dicho polipéptido. En particular, dicha molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende dos restos que se pueden unir específicamente a un antígeno de la célula diana.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) dos restos que se pueden unir específicamente a un antígeno de célula diana y

(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 TNF o dos fragmentos de los mismos que están conectados entre sí mediante un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo,

en el que los dos restos que se pueden unir específicamente a un antígeno de la célula diana se unen a dos antígenos diferentes de la célula diana.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se define anteriormente en el presente documento, en el que el resto que se puede unir

específicamente a un antígeno de la célula diana se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y una proteína de unión a antígeno supercóntigo.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se describe anteriormente en el presente documento, en el que el resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana se selecciona del grupo que consiste en un fragmento de anticuerpo, una molécula Fab, una molécula Fab de entrecruzamiento, una molécula Fab monocatenaria, una molécula Fv, una molécula scFv, un anticuerpo de dominio único, un aVH y una proteína de unión a antígeno supercóntigo. En un aspecto, el resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana es un aVH o una proteína de unión a antígeno supercóntigo. En un aspecto, el resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana es una proteína de unión a antígeno supercóntigo que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana.

En particular, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende uno o dos restos que se pueden unir específicamente a un antígeno de la célula diana.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que el resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana es una molécula Fab o una molécula Fab de entrecruzamiento que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana. En particular, el resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana es una Fab que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que un péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer conector peptídico se fusiona en su extremo C con el dominio CH1 de una cadena pesada mediante un segundo conector peptídico y en el que un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C con el dominio CL de una cadena ligera mediante un tercer conector peptídico.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que un péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer conector peptídico se fusiona en su extremo C con el dominio CL de una cadena pesada mediante un segundo conector peptídico y en el que un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C con el dominio CH1 de una cadena ligera mediante un tercer conector peptídico.

En otro aspecto, la divulgación se dirige a una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que un péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer conector peptídico se fusiona en su extremo C con el dominio CL de una cadena ligera mediante un segundo conector peptídico y en el que un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C con el dominio CH1 de la cadena pesada mediante un tercer conector peptídico.

En un aspecto particular, la divulgación se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se define anteriormente, en el que el conector peptídico es $(G4S)_2$. En un aspecto, el primer conector peptídico es $(G4S)_2$ (SEQ ID NO: 13), el segundo conector peptídico es GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 57) y el tercer conector peptídico es $(G4S)_2$ (SEQ ID NO: 13). En particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de TNF como se define anteriormente, en el que el primer conector peptídico es $(G4S)_2$ (SEQ ID NO: 13), el segundo conector peptídico es $(G4S)_2$ (SEQ ID NO: 13), y el tercer conector peptídico es $(G4S)_2$ (SEQ ID NO: 13).

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se define anteriormente en el presente documento comprende un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable.

En particular, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende (a) una molécula Fab que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana, en la que la cadena pesada de Fab se fusiona en el extremo C con el extremo N de un dominio CH2 en el dominio Fc y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable.

En otro aspecto, el dominio Fc es una IgG, en particular un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. Más en particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1. En un aspecto particular, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc.

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 que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF 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 forma 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 selección indeseable de los anticuerpos biespecíficos de la invención con respecto a células que expresen receptores Fc en lugar de con respecto a células que tengan el antígeno preferentes. En consecuencia, en aspectos particulares, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF 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 funcön 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 mediante 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 una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF proporcionada 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 de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana,

(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 TNF 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 dicho miembro de la familia de ligandos de TNF 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 o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor Fc, en particular al receptor Fcγ.

En un aspecto, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende una o más mutaciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor Fc y/o función efectora. Típicamente, la misma una 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 una molécula de unión a antígeno que contiene ligandos de la familia de TNF triméricos de acuerdo con la invención que comprende un dominio Fc de con las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G ("P329G LALA", numeración) 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 Fcγ de un dominio Fc de IgG1 humana y se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2012/130831 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. La "numeración EU" se refiere a la numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

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 Fc incluyen mutantes Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 con 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 Fcγ de IgG4 y sus propiedades de unión al receptor de Fc se describen también en el documento WO 2012/130831.

Se pueden preparar dominios Fc mutantes por deleción, 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 (SPR) usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores de Fc tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. Un ensayo de unión de este tipo adecuado se describe en el presente documento. De forma alternativa, se puede evaluar la afinidad de unión de dominios Fc o moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos que comprenden un dominio Fc por los receptores de Fc usando líneas celulares conocidas por expresar receptores de Fc particulares, tales como linfocitos NK humanos que expresan el receptor de FcγIIIa.
La función efectora de un dominio Fc, o de los anticuerpos biespecíficos 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 USA83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom etal., 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 ensayos 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 CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de 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 modos de realización, se reduce la unión del dominio Fc a un componente del complemento, específicamente a C1q. En consecuencia, en algunos modos de realización en los que el dominio Fc se genomanipula para tener una función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye una CDC reducida. Se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si los anticuerpos biespecíficos de la invención se pueden unir a C1q y, de ahí que tengan actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO2006/029879 y WO2005/100402. 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 et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

En un aspecto particular, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc.

Modificaciones en el dominio Fc que promueven la heterodimerización

En un aspecto, las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF comprenden (a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana, (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 TNF 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 dicho miembro de la familia de ligandos de TNF 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 o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor Fc, en particular hacia el receptor FcγPor tanto, comprenden restos diferentes, fusionados a una u otra de las dos subunidades del dominio Fc que típicamente están comprendidas en dos cadenas polipeptídicas no idénticas ("cadenas pesadas"). 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 las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF en la producción recombinante, será ventajoso, por tanto, introducir en el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención una modificación que

promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

En consecuencia, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más extensa entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana es en el dominio CH3 del dominio Fc. Por tanto, dicha modificación se encuentra en particular 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, en un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se describe anteriormente en el presente documento, que comprende una molécula de IgG, en el que la parte Fc de la primera cadena pesada comprende un primer módulo de dimerización y la parte Fc de la segunda cadena pesada comprende un segundo módulo de dimerización que permite una heterodimerización de las dos cadenas pesadas de la molécula de IgG y el primer módulo de dimerización comprende botones y el segundo módulo de dimerización comprende ojales de acuerdo con la tecnología de botón en ojal.

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 particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tenga un volumen de cadena lateral más grande, para generar 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 tenga un volumen de cadena lateral más pequeño, para generar de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad en la que se pueda 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 peptídica.

En un aspecto específico, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de triptófano (T366W), y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc el residuo de tirosina en la posición 407 se reemplaza con un residuo de valina (Y407V). Más en particular, en la segunda subunidad del dominio Fc adicionalmente el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza por un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se reemplaza por un residuo de alanina (L368A). Más en particular, en la primera subunidad del dominio Fc adicionalmente el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza por un residuo de cisteína (S354C), y en la segunda subunidad del dominio Fc adicionalmente el residuo de tirosina en la posición 349 se reemplaza 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. El puente disulfuro estabiliza adicionalmente el dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

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 WO2009/089004. En general, este procedimiento implica el reemplazo de uno o más residuos aminoacídicos en la interfase de las dos subunidades del dominio Fc por residuos aminoacídicos cargados de modo que la formación de homodímeros se vuelve electrostáticamente desfavorable pero la heterodimerización electrostáticamente favorable.

Modificaciones en los dominios CH1/CL

Para mejorar aún más el emparejamiento correcto, las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF pueden 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 que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, 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) y en la posición 213 (numeración UE) se han sustituido por ácido glutámico (E).

Más en particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que en el dominio CL contiguo al miembro de la familia de ligandos de TNF, 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 TNF, los aminoácidos en la posición 147 (numeración UE) y en la posición 213 (numeración UE) se han sustituido por ácido glutámico (E).

Moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF particulares

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que la molécula de unión a antígeno comprende

una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana,

un primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer conector peptídico fusionado en su extremo C por un segundo conector peptídico a una segunda cadena pesada o ligera,

y un segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF fusionado en su extremo C por un tercer conector peptídico a una segunda cadena ligera o pesada, respectivamente.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que el primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí por un primer conector peptídico se fusiona en su extremo C por un segundo conector peptídico a un dominio CH1 que es parte de una cadena pesada, y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C mediante un tercer conector peptídico con un dominio CL que es parte de una cadena ligera.

Aún en otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que el primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí por un primer conector peptídico se fusiona en su extremo C mediante un segundo conector peptídico con un dominio CL que es parte de una cadena pesada,

y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo que se fusiona en su extremo C por un tercer conector peptídico a un dominio CH1 que es parte de una cadena ligera.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que el primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer conector peptídico se fusiona en su extremo C mediante un segundo conector peptídico con un dominio VH que es parte de una cadena pesada,

y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C mediante un conector peptídico con un dominio VL que es parte de una cadena ligera.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que en el dominio CL contiguo al miembro de la familia de ligandos de TNF, 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 TNF, los aminoácidos en la posición 147 (numeración UE) y en la posición 213 (numeración UE) se han sustituido por ácido glutámico (E). Estas modificaciones dan lugar a los llamados residuos cargados con propiedades ventajosas que evitan efectos no deseados tales como, por ejemplo, el emparejamiento erróneo.

Moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que el antígeno de la célula diana es CD19

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que el antígeno de la célula diana es CD19.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que el resto 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: 195 o SEQ ID NO: 252, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 196 o SEQ ID NO: 253, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 197 o SEQ ID NO: 254, y un dominio VL que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 198 o SEQ ID NO: 249, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 199 o SEQ ID NO: 250, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 200 o SEQ ID NO: 251.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, en el que el resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD19 y comprende un dominio VH que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 195, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 196 y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 197; y un dominio VL que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 198, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 199 y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 200.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, en el que el resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD19 y comprende un dominio VH que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 252, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 253 y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 254; y un dominio VL que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 249, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 250 y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 251.

En otro aspecto, el resto que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202.

En otro aspecto, el resto que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358.

En un aspecto, el resto que se puede unir específicamente a CD19 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 o en el que el resto que se puede unir específicamente a CD19 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358.

En un aspecto particular, el resto que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 y la región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202. En otro aspecto particular, el resto que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y la región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358.

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202, 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: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99; 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: 96, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

En un aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF

comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202, y

(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 de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358, 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: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99; 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: 96, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

En un aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358, y

(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 de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que la molécula de unión a antígeno comprende

una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana,

una segunda cadena pesada que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer conector peptídico que se fusiona en su extremo C mediante un segundo conector peptídico con un dominio CH1, y una segunda cadena ligera que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C mediante un tercer conector peptídico con un dominio CL, y en el que la molécula de unión a antígeno comprende

(i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 o

una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358,

(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 111 y SEQ ID NO: 113, y

(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112 y SEQ ID NO: 114.

En otro aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que la molécula de unión a antígeno comprende

una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana,

una segunda cadena pesada que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer conector peptídico se fusiona en su extremo C mediante un segundo conector peptídico con un dominio CL, y una segunda cadena ligera que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C mediante un tercer conector peptídico con un dominio CH1, y en el que la molécula comprende

(i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 o

una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358,

(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119 y SEQ ID NO: 173, y
(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120 y SEQ ID NO: 174.

Además, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana, y

(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 contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en el que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí y al extremo C del dominio CH3 mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico al extremo C del dominio CH3 de dicho polipéptido.

En un aspecto particular, dicha molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende dos restos que se pueden unir específicamente a un antígeno de la célula diana.

Más en particular, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF comprende

(i) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 209, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 210 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, o

(ii) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 213, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 214 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, o

(iii) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 310 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 279, o

(iv) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 313, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 314 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 279.

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, seleccionada del grupo que consiste en:

a) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 205, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116;

b) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 205, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, una

segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118;

c) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 209 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 210;

d) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 205, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120;

e) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 205, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174; y

f) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 213 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 214.

En particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 205, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, seleccionada del grupo que consiste en:

a) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116;

b) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118;

c) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 209 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 210;

d) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120;

e) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174; y

f) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 213 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 214.

En particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120.

Polinucleótidos

La divulgación proporciona además polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se describe en el presente documento o un fragmento de la misma.

Los polinucleótidos aislados que codifican moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de TNF 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 porción de la cadena ligera de una inmunoglobulina por un polinucleótido separado de la porción de la cadena pesada de inmunoglobulina. Cuando se coexpresan, los polipéptidos de cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de cadena ligera para formar la inmunoglobulina.

En algunos aspectos, el polinucleótido aislado codifica toda la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se describe en el presente documento. En particular, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido comprendido en la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se describe en el presente documento.
En un aspecto, la presente divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF, en el que el polinucleótido comprende (a) una secuencia que codifica un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana, (b) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un conector peptídico y (c) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de 4-1BB, en el que el polinucleótido comprende (a) una secuencia que codifica un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana, (b) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende dos ectodominios de 4-1BBL o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un conector peptídico y (c) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo.

En otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende dos fragmentos de 4-1BBL que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 98 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 96, y a un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un fragmento de 4-1BBL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 98 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 96.

Además, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de OX40, en el que el polinucleótido comprende (a) una secuencia que codifica un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana, (b) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende dos ectodominios de OX40L o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un conector peptídico y (c) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un ectodominio de OX40L o un fragmento del mismo.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende dos fragmentos de 4-1BBL que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 98 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54, y a un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un fragmento de 4-1BBL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 98 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54.

En otros aspectos, la divulgación se refiere a los polinucleótidos que comprenden una secuencia que es al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 98 % o 100 % idéntica a las secuencias de ADNc específicas divulgadas en el presente documento. En un aspecto particular, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia que es idéntica a una de las secuencias de ADNc específicas divulgadas en el presente documento.

En otros aspectos, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 6, 97, 98, 99, 183, 184 o 185. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos como se establece en una cualquiera de las SEQ ID NO: 14, 15, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115.116, 117, 118, 119, 120, 173 o 174.

Todavía en otros aspectos, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 66, 67, 68, 69, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 137, 138, 141, 142, 143, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 162, 163, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 203, 204, 207, 208, 211, 212, 215, 216, 273, 274, 277, 278, 281, 282, 285, 286, 289, 290, 293, 294, 297, 298, 301, 302, 305, 307, 308, 311, 312, 315, 316, 331, 332, 335, 336, 339, 340, 343, 344, 347, 348, 353 o 354.

En determinados aspectos, 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

Las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención se pueden obtener, por ejemplo, por síntesis de péptidos en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, uno o más polinucleótidos que codifican la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF o fragmentos polipeptídicos de la misma, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aíslan y se insertan en uno o más vectores para 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 son bien conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF (fragmento) junto con señales de control de transcripción/traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación/recombinación genética in vivo. 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 la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF o fragmentos polipeptídicos de la misma (es decir, la región codificante) se clona en asociación funcional con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o traducción. Como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción 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, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores transcripcionales, intrones, regiones no traducidas 5' y 3' y similares, no es parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes pueden estar presentes en una única construcción polinucleotídica, por ejemplo, en un único vector, o en construcciones polinucleotídicas separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una región codificante individual, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan pos- o cotraduccionalmente 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 la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF 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 para 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 para 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 finalización de la transcripción, se pueden asociar de forma funcional con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica celular.

Los promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción se divulgan en el presente documento. Una variedad de regiones de control de la transcripción son conocidas por los expertos en la técnica. 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. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos tisulares, así como promotores inducibles (por ejemplo, promotores inducibles de tetraciclinas). De forma similar, una variedad de elementos de control de la traducción son conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a sitios de unión a ribosomas, codones de iniciación y finalización de la traducción y elementos derivados de sistemas víricos (en particular un sitio de entrada al 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 de la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF o fragmentos polipeptídicos de la misma, se puede disponer el ADN que codifica una secuencia de señal corriente arriba del ácido nucleico que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o fragmentos polipeptídicos de la misma. 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 secretados por células de vertebrado en general tienen un péptido señal fusionado al extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En ciertos modos de realización se usa el péptido señalizador natural, p. ej., un péptido señalizador 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 operativamente asociado a él. De forma alternativa, se puede usar un péptido señal de mamífero heterógeno, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder natural se puede sustituir con 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 una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o fragmentos polipeptídicos de la misma.

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) una moléculas de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF. 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. Véanse 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 de células de mamífero que se adaptan para el cultivo en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped 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 (BRL3A), 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 en 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). Las tecnologías estándar son conocidas en la técnica por expresar genes exógenos en estos sistemas. Se pueden genomanipular células que expresen 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 tal manera que el producto expresado sea una inmunoglobulina que tenga tanto una cadena pesada como una ligera.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para producir una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF o fragmentos polipeptídicos de la misma, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende polinucleótidos que codifican la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o fragmentos polipeptídicos de la misma, como se proporciona en el presente documento, en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o fragmentos polipeptídicos de la misma, y recuperar la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o fragmentos polipeptídicos de la misma a partir de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

En la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, los componentes (al menos un resto que se puede unir específicamente a un antígeno de la célula diana, un polipéptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo y un polipéptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de la familia de TNF o un fragmento del mismo) no se fusionan genéticamente entre sí. Los polipéptidos se diseñan de modo que sus componentes (dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo y otros componentes tales como CH o CL) se fusionan entre sí directamente o a través de una secuencia conectora. La composición y longitud del conector se pueden determinar de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica y se pueden someter a prueba para determinar su eficacia. En las secuencias proporcionadas en el presente documento se encuentran ejemplos de secuencias conectoras entre diferentes componentes de las moléculas de unión a antígeno de la invención. Si se desea, también se pueden incluir secuencias adicionales para incorporar un sitio de escisión para separar los componentes individuales de la proteína de fusión, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de endopeptidasas.

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 peptídica 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 comprenden cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase, por ejemplo la patente de EE. UU. n.º 5.969.108 para 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 humano, se puede usar una forma quimérica de inmunoglobulina en la que las regiones constantes de la inmunoglobulina sean de un ser 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 por 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 retención de los residuos estructurales críticos (por ejemplo, los que son importantes para conservar buena

afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpo), (b) injertar solo las regiones determinantes de especificidad no humanas (SDR o a-CDR; los residuos críticos para la interacción anticuerpo-antígeno) en regiones estructurales y constantes humanas, o (c) trasplantar todos los dominios variables no humanos, pero "enmascararlos" con una sección similar a humana por reemplazo de residuos de superficie. 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); 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); Verhoeyen et al., Science 239, 1534-1536 (1988); Padlan, Molec Immun 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri 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" al reordenamiento de FR). Las inmunoglobulinas particulares de acuerdo con la invención son inmunoglobulinas humanas. Los anticuerpos humanos y regiones variables humanas se pueden producir 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 derivar 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., New York, 1987)). También se pueden preparar anticuerpos humanos y regiones variables humanas administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos inalterados o anticuerpos inalterados con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigénica (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, los restos que se pueden unir específicamente a un antígeno de la célula diana (por ejemplo, fragmentos Fab) comprendidos en las moléculas de unión a antígeno de la presente invención se genomanipulan para que tengan una afinidad de unión potenciada de acuerdo con, por ejemplo, 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 antigénico específico a través de un ensayo de inmunoadsorción 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).

Las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de TNF de la invención preparadas como se describe en el presente documento se pueden purificar por 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 que contiene un trímero de ligando de TNF. Por ejemplo, para la purificación mediante 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 que contiene un trímero de ligando de TNF 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 un trímero de ligando de TNF, expresadas como se describe en los ejemplos, estaban intactas y apropiadamente ensambladas como se demuestra mediante SDS-PAGE reductora y no reductora.

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 conocidos en la técnica.

1. Ensayos de afinidad

La afinidad de la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF 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 que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF por el antígeno de la célula diana se puede determinar también 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. En el ejemplo 4 se describe un modo de realización ilustrativo y ejemplar específico para medir la afinidad de unión. De acuerdo con un aspecto, se mide K_D por resonancia de plasmón superficial usando una máquina BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

2. Ensayos de unión y otros ensayos

La unión de la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF proporcionada en el presente documento a las células que expresan el receptor correspondiente se puede evaluar usando líneas celulares que expresan el receptor particular o el antígeno diana, por ejemplo, mediante citometría de flujo (FACS). En un aspecto, en el ensayo de unión se usan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) frescas que expresan el receptor de TNF. Estas células se usan directamente después del aislamiento (PMBC indiferenciadas) o después de la estimulación (PMBC activadas). En otro aspecto, se usaron esplenocitos de ratón activados (que expresan la molécula receptora de TNF) para demostrar la unión de la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF a las células que expresan el receptor de TNF correspondiente.

En otro aspecto, se usaron líneas de células cancerosas que expresan el antígeno de la célula diana para demostrar la unión de las moléculas de unión a antígeno al antígeno de la célula diana.

En otro aspecto, los ensayos de competición se pueden usar para identificar una molécula de unión a antígeno que compite con un anticuerpo específico o molécula de unión a antígeno por unirse a la diana o al receptor de TNF, respectivamente. En determinados modos de realización, dicha molécula de unión a antígeno competidora se une al mismo epítopo (por ejemplo, un epítopo lineal o conformacional) que está unido por un anticuerpo específico anti-diana o un anticuerpo específico del receptor anti-TNF. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítopo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

3. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia DE TNF que se unen a un antígeno específico de la célula diana y a un receptor de TNF específico que tiene actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, señalización agonista a través del receptor de TNF en células que expresan el antígeno de la célula diana. También se proporcionan moléculas de unión a antígeno que contienen trímeroS de ligandoS de la familia de TNF identificadas por los ensayos por tener dicha actividad biológica in vitro.

En determinados aspectos, una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF se somete a prueba para determinar dicha actividad biológica. Los ensayos para detectar la actividad biológica de las moléculas de la invención son los descritos en el ejemplo 6. Además, los ensayos para detectar la lisis celular (por ejemplo, mediante medición de la liberación de LDH), la cinética de la apoptosis inducida (por ejemplo, mediante la medición de la actividad de la caspasa 3/7) o la apoptosis (por ejemplo, usando el ensayo de TUNEL) son bien conocidos en la técnica. Además, la actividad biológica de dichos complejos se puede evaluar

evaluando sus efectos sobre la supervivencia, la proliferación y la secreción de linfocinas de diversos subconjuntos de linfocitos, tales como linfocitos NK, linfocitos NKT o linfocitos T γδ o evaluando su capacidad para modular el fenotipo y la función del antígeno que presentan células, tales como células dendríticas, monocitos/macrófagos o linfocitos B.

Composiciones farmacéuticas, formulaciones y vías de administración

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF proporcionadas 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 cualquiera de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF proporcionadas en el presente documento y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF proporcionadas en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

Las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de *unión* a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF disueltas o dispersadas en un excipiente farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son en general no tóxicas para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, es decir no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción indeseable cuando se administra a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF y opcionalmente un ingrediente activo adicional serán conocidos para el experto en la técnica en vista de la presente divulgación, como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.ª ed. Mack Printing Company, 1990, incorporada en el presente documento por 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 un experto en la técnica.

Las composiciones parenterales incluyen las 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 que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. 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 conseguir 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 preferentes de preparación 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. El medio líquido se debe tamponar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido se debe volver isotónico en primer lugar antes de la inyección con solución salina o glucosa suficiente. La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas se debe mantener al mínimo 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 octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; 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 polietilenglicol (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 poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan 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 modos de realización particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable se puede conseguir por 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 del presente documento incluyen, además, agentes de dispersión intersticial del fármaco, tales como glucoproteínas de hialuronidasa neutra-activa soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, 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 glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

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 WO2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón acetato-histidina.

Además de las composiciones descritas previamente, las proteínas de fusión 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 proteínas de fusión de la invención se pueden fabricar por medio de procedimientos convencionales de mezclado, disolución, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. 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.

Las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF se pueden formular en una composición en forma de ácido o base libre, neutra o salina. 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 proteica, 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 dichas bases orgánicas 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.

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 adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Las formulaciones que se van a usar para la administración in vivo son, en general, estériles. La esterilidad se puede conseguir fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Procedimientos y composiciones terapéuticos

Se puede usar cualquiera de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF proporcionadas en el presente documento en procedimientos terapéuticos.

Para su uso en procedimientos terapéuticos, las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención se pueden formular, dosificar y administrar de una manera consecuente con una buena práctica médica. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos.

En un aspecto, se proporcionan moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF para su uso como medicamento. En otros aspectos, se proporcionan moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en el tratamiento de una enfermedad, en particular para su uso en el tratamiento del cáncer. En determinados aspectos, se proporcionan moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en un procedimiento de tratamiento. En un aspecto, la divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesita el mismo. En determinados aspectos, la enfermedad que se va a tratar es cáncer. Ejemplos de cánceres incluyen tumores sólidos, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de sangre, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, cáncer de hueso y cáncer de riñón, melanoma, linfoma de linfocitos B, leucemia de linfocitos B, linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica aguda. Por tanto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento del cáncer. El sujeto, paciente o "individuo" que necesita tratamiento es típicamente un mamífero, más específicamente un ser humano.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas, en particular para el tratamiento de infecciones virales. En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como, por ejemplo, la enfermedad del lupus.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF en la fabricación o preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesite el mismo. En un aspecto, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un individuo que tiene la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En determinados modos de realización, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo, en particular cáncer. Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere al uso de una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención en la fabricación o preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Ejemplos de cánceres incluyen tumores sólidos, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de sangre, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, cáncer de hueso y cáncer de riñón, melanoma, linfoma de células B, leucemia de células B, linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica aguda. Un experto en la técnica puede reconocer fácilmente que en muchos casos la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF puede no proporcionar una cura sino que solo proporciona un beneficio parcial. En algunos aspectos, un cambio fisiológico que tiene algo de beneficio también se considera terapéuticamente beneficioso. Por tanto, en algunos aspectos, una cantidad de molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que proporciona un cambio fisiológico se considera una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz".

En otro aspecto, la divulgación se refiere al uso de una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF como se describe en el presente documento en la fabricación o preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas, en particular para el tratamiento de infecciones virales o para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, la enfermedad del lupus.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF (cuando se usa sola o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, la vía de administración, el peso corporal del paciente, el tipo de proteína de fusión, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si la proteína de fusión se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, las intervenciones terapéuticas previas o simultáneas, la anamnesis del paciente y la respuesta a la proteína de fusión, y el criterio del médico especialista. El profesional responsable para su administración determinará, en cualquier caso, la concentración del/de los ingrediente(s) activo(s) en una composición y la(s) dosis apropiada(s) para el sujeto individual. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación incluyendo, pero sin limitarse a, administraciones individuales o múltiples durante diversos puntos temporales, administración en bolo e infusión

pulsada.

La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg − 10 mg/kg) de la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF puede ser una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por 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, el tratamiento en general se mantendría hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar de la proteína de fusión estaría en el intervalo desde aproximadamente 0.005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En otros ejemplos, una dosis también puede comprender desde aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 200 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 350 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración y cualquier intervalo derivable en los mismos. En ejemplos de un intervalo derivable de los números enumerados en el presente documento, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, etc., en base a los números descritos anteriormente. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Se pueden administrar intermitentemente dichas dosis, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal manera que el paciente reciba desde aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis de la proteína de fusión). Se puede administrar una dosis de carga mayor inicial, seguido de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. La progresión de este tratamiento se sigue fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF se usarán en general en una cantidad eficaz para lograr el propósito previsto. Para su uso para tratar o prevenir un estado de enfermedad, las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF o composiciones farmacéuticas de las mismas, se administran o se aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, en especial en vista de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para la administración sistémica, se puede estimar inicialmente una dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos in vitro, tales como ensayos de cultivo celular. A continuación se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en circulación que incluye la CI_{50} como se determina en cultivo celular. Se puede usar dicha información para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos.

También se pueden estimar dosificaciones iniciales a partir de datos in vivo, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que son bien conocidas en la técnica. Un experto en la técnica podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos en base a los datos en animales.

La cantidad e intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles plasmáticos de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF que sean suficientes para mantener un efecto terapéutico. Las dosificaciones de paciente habituales para administración por inyección varían de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg/día, típicamente de aproximadamente 0,5 a 1 mg/kg/día. Se pueden lograr niveles plasmáticos terapéuticamente eficaces administrando dosis múltiples cada día. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por HPLC.

En los casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF puede no estar relacionada con la concentración plasmática. Un experto en la técnica podrá optimizar dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin experimentación excesiva.

Una dosis terapéuticamente eficaz de las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF descritas en el presente documento proporcionará en general beneficio terapéutico sin provocar toxicidad sustancial. Se pueden determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de una proteína de fusión mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o en animales de experimentación. Se pueden usar ensayos de cultivo celular y estudios en animales para determinar la DL_{50} (la dosis letal para un 50 % de una población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en un 50 % de una población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que se puede expresar como la proporción DL_{50}/DE_{50}. Se

prefieren las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF que presentan altos índices terapéuticos. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de acuerdo con la presente invención presenta un índice terapéutico alto. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificaciones adecuadas para su uso en seres humanos. Preferentemente, la dosificación se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, la forma de dosificación empleada, la vía de administración utilizada, la afección del sujeto, y similares. La formulación exacta, vía de administración y dosificación se pueden elegir por el médico individual en vista de la afección del paciente (véase, por ejemplo, Fingl et al., 1975, en: The Pharmacological Basis of Therapeutics, cap. 1, pág. 1, incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad).

El médico especialista para pacientes tratados con las proteínas de fusión de la invención sabrá cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la administración debido a la toxicidad, disfunción orgánica y similares. A la inversa, el médico especialista también sabrá ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuera adecuada (excluyendo la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el abordaje del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección que se va a tratar, con la vía de administración, y similares. La gravedad de la afección, por ejemplo, se puede evaluar, en parte, por procedimientos de evaluación de pronóstico estándar. Además, la dosis y quizás la frecuencia de dosis también variarán de acuerdo con la edad, peso corporal, y respuesta del paciente individual.

Otros agentes y tratamientos

Las moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF se pueden administrar en combinación con uno o más de otros agentes en el 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 el que tiene actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. En determinados modos de realización, un agente terapéutico es un agente antineoplásico adicional.

Dichos otros agentes están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. 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 que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describe 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 dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma composición o en composiciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso se puede producir la administración de la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF antes de, simultáneamente a y/o después de la administración del adyuvante y/o agente terapéutico adicional.

Artículos de fabricación

En otro aspecto, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación 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 un agente activo en la composición es una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de TNF de la invención.

La ficha técnica o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de TNF; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende otro agente citotóxico o de otro modo terapéutico. El artículo de fabricación en este modo de realización puede comprender además un prospecto del envase que indique que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular.

De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación 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 C (Secuencias):

SEQ ID NO:	Denominación	Secuencia
1	4-1BBL humano (hu) (71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSE
2	4-1BBL hu (85-254)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
3	4-1BBL hu (80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
4	4-1BBL hu (52-254)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSG SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
5	4-1BBL hu dimérico (71-254) conectado mediante conector $(G4S)_2$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGM FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
6	4-1BBL hu monomérico (71-254) más conector $(G4S)_2$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGS
7	CDR-H1 FAP(28H1)	SHAMS
8	CDR-H2 FAP(28H1)	AIWASGEQYYADSVKG
9	CDR-H3 FAP(28H1)	GWLGNFDY
10	CDR-L1 FAP(28H1)	RASQSVSRSYLA
11	CDR-L2 FAP(28H1)	GASTRAT
12	CDR-L3 FAP(28H1)	QQGQVIPPT

13	$(G4S)_2$	GGGGSGGGGS
14	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CH1 cadena de botón Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGM FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CL	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
16	VH FAP(28H1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHA MSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWLGNFDYWGQGTLVTVSS
17	VL FAP(28H1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLA WYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGT KVEIK
18	cadena de ojal Fc anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2
19	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2
20	FAP humana (hu)	UniProt n.º Q12884
21	ectodominio FAP hu+marca poli-lisina+marca his_6	RPSRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFFPNWIS GQEYLHQSADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNA SNYGLSPDRQFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIYDLS

		NGEFVRGNELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYL KQRPGDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYEEEMLATK YALWWSPNGKFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYP RTINIPYPKAGAKNPVVRIFIIDTTYPAYVGPQEVPVP AMIASSDYYFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQNVSVL SICDFREDWQTWDCPKTQEHIEESRTGWAGGFFVST PVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITS GKWEAINIFRVTQDSLFYSSNEFEEYPGRRNIYRISIGS YPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCY GPGIPISTLHDGRTDQEIKILEENKELENALKNIQLPKE EIKKLEVDEITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGG PCSQSVRSVFAVNWISYLASKEGMVIALVDGRGTAF QGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQITAVRKFIEMGFIDE KRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGIAVAPVSS WEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAE YFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQV DFQAMWYSDQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFS LSDGKKKKKKGHHHHHH
22	Secuencia de nucleótidos, ectodominio FAP hu+marca poli-lisina+marca his_6	CGCCCTTCAAGAGTTCATAACTCTGAAGAAAATAC AATGAGAGCACTCACACTGAAGGATATTTTAAATG GAACATTTTCTTATAAAACATTTTTTCCAAACTGGA TTTCAGGACAAGAATATCTTCATCAATCTGCAGAT AACAATATAGTACTTTATAATATTGAAACAGGACA ATCATATACCATTTTGAGTAATAGAACCATGAAAA GTGTGAATGCTTCAAATTACGGCTTATCACCTGAT CGGCAATTTGTATATCTAGAAAGTGATTATTCAAA GCTTTGGAGATACTCTTACACAGCAACATATTACA TCTATGACCTTAGCAATGGAGAATTTGTAAGAGGA AATGAGCTTCCTCGTCCAATTCAGTATTTATGCTGG TCGCCTGTTGGGAGTAAATTAGCATATGTCTATCA AAACAATATCTATTTGAAACAAAGACCAGGAGAT CCACCTTTTCAAATAACATTTAATGGAAGAGAAAA TAAAATATTTAATGGAATCCCAGACTGGGTTTATG AAGAGGAAATGCTTGCTACAAAATATGCTCTCTGG TGGTCTCCTAATGGAAAATTTTTGGCATATGCGGA ATTTAATGATACGGATATACCAGTTATTGCCTATTC CTATTATGGCGATGAACAATATCCTAGAACAATAA ATATTCCATACCCAAAGGCTGGAGCTAAGAATCCC GTTGTTCGGATATTTATTATCGATACCACTTACCCT GCGTATGTAGGTCCCCAGGAAGTGCCTGTTCCAGC AATGATAGCCTCAAGTGATTATTATTTCAGTTGGC TCACGTGGGTTACTGATGAACGAGTATGTTTGCAG TGGCTAAAAAGAGTCCAGAATGTTTCGGTCCTGTC TATATGTGACTTCAGGGAAGACTGGCAGACATGGG ATTGTCCAAAGACCCAGGAGCATATAGAAGAAAG CAGAACTGGATGGGCTGGTGGATTCTTTGTTTCAA CACCAGTTTTCAGCTATGATGCCATTTCGTACTACA AAATATTTAGTGACAAGGATGGCTACAAACATATT CACTATATCAAAGACACTGTGGAAAATGCTATTCA AATTACAAGTGGCAAGTGGGAGGCCATAAATATA TTCAGAGTAACACAGGATTCACTGTTTTATTCTAG CAATGAATTTGAAGAATACCCTGGAAGAAGAAAC

		ATCTACAGAATTAGCATTGGAAGCTATCCTCCAAG CAAGAAGTGTGTTACTTGCCATCTAAGGAAAGAAA GGTGCCAATATTACACAGCAAGTTTCAGCGACTAC GCCAAGTACTATGCACTTGTCTGCTACGGCCCAGG CATCCCCATTTCCACCCTTCATGATGGACGCACTG ATCAAGAAATTAAAATCCTGGAAGAAAACAAGGA ATTGGAAAATGCTTTGAAAAATATCCAGCTGCCTA AAGAGGAAATTAAGAAACTTGAAGTAGATGAAAT TACTTTATGGTACAAGATGATTCTTCCTCCTCAATT TGACAGATCAAAGAAGTATCCCTTGCTAATTCAAG TGTATGGTGGTCCCTGCAGTCAGAGTGTAAGGTCT GTATTTGCTGTTAATTGGATATCTTATCTTGCAAGT AAGGAAGGGATGGTCATTGCCTTGGTGGATGGTCG AGGAACAGCTTTCCAAGGTGACAAACTCCTCTATG CAGTGTATCGAAAGCTGGGTGTTTATGAAGTTGAA GACCAGATTACAGCTGTCAGAAAATTCATAGAAAT GGGTTTCATTGATGAAAAAAGAATAGCCATATGGG GCTGGTCCTATGGAGGATACGTTTCATCACTGGCC CTTGCATCTGGAACTGGTCTTTTCAAATGTGGTATA GCAGTGGCTCCAGTCTCCAGCTGGGAATATTACGC GTCTGTCTACACAGAGAGATTCATGGGTCTCCCAA CAAAGGATGATAATCTTGAGCACTATAAGAATTCA ACTGTGATGGCAAGAGCAGAATATTTCAGAAATGT AGACTATCTTCTCATCCACGGAACAGCAGATGATA ATGTGCACTTTCAAAACTCAGCACAGATTGCTAAA GCTCTGGTTAATGCACAAGTGGATTTCCAGGCAAT GTGGTACTCTGACCAGAACCACGGCTTATCCGGCC TGTCCACGAACCACTTATACACCCACATGACCCAC TTCCTAAAGCAGTGTTTCTCTTTGTCAGACGGCAA AAAGAAAAAGAAAAAGGGCCACCACCATCACCAT CAC
23	FAP de ratón	UniProt n.º P97321
24	ectodominio FAP murina+marca poli-lisina+marca his_6	RPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGTFSYKTYFPNWIS EQEYLHQSEDDNIVFYNIETRESYIILSNSTMKSVNAT DYGLSPDRQFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIYDLQN GEFVRGYELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLK QRPGDPPFQITYTGRENRIFNGIPDWVYEEEMLATKY ALWWSPDGKFLAYVEFNDSDIPIIAYSYYGDGQYPR TINIPYPKAGAKNPVVRVFIVDTTYPHHVGPMEVPVP EMIASSDYYFSWLTWVSSERVCLQWLKRVQNVSVL SICDFREDWHAWECPKNQEHVEESRTGWAGGFFVST PAFSQDATSYYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITS GKWEAIYIFRVTQDSLFYSSNEFEGYPGRRNIYRISIG NSPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSYKAKYYALVC YGPGLPISTLHDGRTDQEIQVLEENKELENSLRNIQLP KVEIKKLKDGGLTFWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVY GGPCSQSVKSVFAVNWITYLASKEGIVIALVDGRGTA FQGDKFLHAVYRKLGVYEVEDQLTAVRKFIEMGFID EERIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGIAVAPVS SWEYYASIYSERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARA EYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQV DFQAMWYSDQNHGILSGRSQNHLYTHMTHFLKQCF SLSDGKKKKKKGHHHHHH

25	Secuencia de nucleótidos, ectodominio FAP murina+marca poli-lisina+marca his_6	CGTCCCTCAAGAGTTTACAAACCTGAAGGAAACAC AAAGAGAGCTCTTACCTTGAAGGATATTTTAAATG GAACATTCTCATATAAAACATATTTTCCCAACTGG ATTTCAGAACAAGAATATCTTCATCAATCTGAGGA TGATAACATAGTATTTTATAATATTGAAACAAGAG AATCATATATCATTTTGAGTAATAGCACCATGAAA AGTGTGAATGCTACAGATTATGGTTTGTCACCTGA TCGGCAATTTGTGTATCTAGAAAGTGATTATTCAA AGCTCTGGCGATATTCATACACAGCGACATACTAC ATCTACGACCTTCAGAATGGGGAATTTGTAAGAGG ATACGAGCTCCCTCGTCCAATTCAGTATCTATGCT GGTCGCCTGTTGGGAGTAAATTAGCATATGTATAT CAAAACAATATTTATTTGAAACAAAGACCAGGAG ATCCACCTTTTCAAATAACTTATACTGGAAGAGAA AATAGAATATTTAATGGAATACCAGACTGGGTTTA TGAAGAGGAAATGCTTGCCACAAAATATGCTCTTT GGTGGTCTCCAGATGGAAAATTTTTGGCATATGTA GAATTTAATGATTCAGATATACCAATTATTGCCTA TTCTTATTATGGTGATGGACAGTATCCTAGAACTA TAAATATTCCATATCCAAAGGCTGGGGCTAAGAAT CCGGTTGTTCGTGTTTTTATTGTTGACACCACCTAC CCTCACCACGTGGGCCCAATGGAAGTGCCAGTTCC AGAAATGATAGCCTCAAGTGACTATTATTTCAGCT GGCTCACATGGGTGTCCAGTGAACGAGTATGCTTG CAGTGGCTAAAAAGAGTGCAGAATGTCTCAGTCCT GTCTATATGTGATTTCAGGGAAGACTGGCATGCAT GGGAATGTCCAAAGAACCAGGAGCATGTAGAAGA AAGCAGAACAGGATGGGCTGGTGGATTCTTTGTTT CGACACCAGCTTTTAGCCAGGATGCCACTTCTTAC TACAAAATATTTAGCGACAAGGATGGTTACAAACA TATTCACTACATCAAAGACACTGTGGAAAATGCTA TTCAAATTACAAGTGGCAAGTGGGAGGCCATATAT ATATTCCGCGTAACACAGGATTCACTGTTTTATTCT AGCAATGAATTTGAAGGTTACCCTGGAAGAAGAA ACATCTACAGAATTAGCATTGGAAACTCTCCTCCG AGCAAGAAGTGTGTTACTTGCCATCTAAGGAAAGA AAGGTGCCAATATTACACAGCAAGTTTCAGCTACA AAGCCAAGTACTATGCACTCGTCTGCTATGGCCCT GGCCTCCCCATTTCCACCCTCCATGATGGCCGCAC AGACCAAGAAATACAAGTATTAGAAGAAAACAAA GAACTGGAAAATTCTCTGAGAAATATCCAGCTGCC TAAAGTGGAGATTAAGAAGCTCAAAGACGGGGGA CTGACTTTCTGGTACAAGATGATTCTGCCTCCTCAG TTTGACAGATCAAAGAAGTACCCTTTGCTAATTCA AGTGTATGGTGGTCCTTGTAGCCAGAGTGTTAAGT CTGTGTTTGCTGTTAATTGGATAACTTATCTCGCAA GTAAGGAGGGGATAGTCATTGCCCTGGTAGATGGT CGGGGCACTGCTTTCCAAGGTGACAAATTCCTGCA TGCCGTGTATCGAAAACTGGGTGTATATGAAGTTG AGGACCAGCTCACAGCTGTCAGAAAATTCATAGA AATGGGTTTCATTGATGAAGAAAGAATAGCCATAT

		GGGGCTGGTCCTACGGAGGTTATGTTTCATCCCTG GCCCTTGCATCTGGAACTGGTCTTTTCAAATGTGG CATAGCAGTGGCTCCAGTCTCCAGCTGGGAATATT ACGCATCTATCTACTCAGAGAGATTCATGGGCCTC CCAACAAAGGACGACAATCTCGAACACTATAAAA ATTCAACTGTGATGGCAAGAGCAGAATATTTCAGA AATGTAGACTATCTTCTCATCCACGGAACAGCAGA TGATAATGTGCACTTTCAGAACTCAGCACAGATTG CTAAAGCTTTGGTTAATGCACAAGTGGATTTCCAG GCGATGTGGTACTCTGACCAGAACCATGGTATATT ATCTGGGCGCTCCCAGAATCATTTATATACCCACA TGACGCACTTCCTCAAGCAATGCTTTTCTTTATCAG ACGGCAAAAAGAAAAAGAAAAAGGGCCACCACCA TCACCATCAC
26	ectodominio FAP de macaco cangrejero+marca poli-lisina+marca his_6	RPPRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFFPNWIS GQEYLHQSADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNA SNYGLSPDRQFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIYDLS NGEFVRGNELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYL KQRPGDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYEEEMLATK YALWWSPNGKFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYP RTINIPYPKAGAKNPFVRIFIIDTTYPAYVGPQEVPVP AMIASSDYYFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQNVSVL SICDFREDWQTWDCPKTQEHIEESRTGWAGGFFVST PVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITS GKWEAINIFRVTQDSLFYSSNEFEDYPGRRNIYRISIG SYPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVC YGPGIPISTLHDGRTDQEIKILEENKELENALKNIQLP KEEIKKLEVDEITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVY GGPCSQSVRSVFAVNWISYLASKEGMVIALVDGRGT AFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQITAVRKFIEMGFI DEKRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGIAVAP VSSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMA RAEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNA QVDFQAMWYSDQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQ CFSLSDGKKKKKKGHHHHHH
27	Secuencia de nucleótidos, ectodominio FAP de macaco cangrejero+marca poli-lisina+marca his_6	CGCCCTCCAAGAGTTCATAACTCTGAAGAAAATAC AATGAGAGCACTCACACTGAAGGATATTTTAAATG GGACATTTTCTTATAAAACATTTTTTCCAAACTGGA TTTCAGGACAAGAATATCTTCATCAATCTGCAGAT AACAATATAGTACTTTATAATATTGAAACAGGACA ATCATATACCATTTTGAGTAACAGAACCATGAAAA GTGTGAATGCTTCAAATTATGGCTTATCACCTGAT CGGCAATTTGTATATCTAGAAAGTGATTATTCAAA GCTTTGGAGATACTCTTACACAGCAACATATTACA TCTATGACCTTAGCAATGGAGAATTTGTAAGAGGA AATGAGCTTCCTCGTCCAATTCAGTATTTATGCTGG TCGCCTGTTGGGAGTAAATTAGCATATGTCTATCA AAACAATATCTATTTGAAACAAAGACCAGGAGAT CCACCTTTTCAAATAACATTTAATGGAAGAGAAAA TAAAATATTTAATGGAATCCCAGACTGGGTTTATG AAGAGGAAATGCTTGCTACAAAATATGCTCTCTGG TGGTCTCCTAATGGAAAATTTTTGGCATATGCGGA

		ATTTAATGATACAGATATACCAGTTATTGCCTATTC CTATTATGGCGATGAACAATATCCCAGAACAATAA ATATTCCATACCCAAAGGCCGGAGCTAAGAATCCT TTTGTTCGGATATTTATTATCGATACCACTTACCCT GCGTATGTAGGTCCCCAGGAAGTGCCTGTTCCAGC AATGATAGCCTCAAGTGATTATTATTTCAGTTGGC TCACGTGGGTTACTGATGAACGAGTATGTTTGCAG TGGCTAAAAAGAGTCCAGAATGTTTCGGTCTTGTC TATATGTGATTTCAGGGAAGACTGGCAGACATGGG ATTGTCCAAAGACCCAGGAGCATATAGAAGAAAG CAGAACTGGATGGGCTGGTGGATTCTTTGTTTCAA CACCAGTTTTCAGCTATGATGCCATTTCATACTACA AAATATTTAGTGACAAGGATGGCTACAAACATATT CACTATATCAAAGACACTGTGGAAAATGCTATTCA AATTACAAGTGGCAAGTGGGAGGCCATAAATATA TTCAGAGTAACACAGGATTCACTGTTTTATTCTAG CAATGAATTTGAAGATTACCCTGGAAGAAGAAAC ATCTACAGAATTAGCATTGGAAGCTATCCTCCAAG CAAGAAGTGTGTTACTTGCCATCTAAGGAAAGAAA GGTGCCAATATTACACAGCAAGTTTCAGCGACTAC GCCAAGTACTATGCACTTGTCTGCTATGGCCCAGG CATCCCCATTTCCACCCTTCATGACGGACGCACTG ATCAAGAAATTAAAATCCTGGAAGAAAACAAGGA ATTGGAAAATGCTTTGAAAAATATCCAGCTGCCTA AAGAGGAAATTAAGAAACTTGAAGTAGATGAAAT TACTTTATGGTACAAGATGATTCTTCCTCCTCAATT TGACAGATCAAAGAAGTATCCCTTGCTAATTCAAG TGTATGGTGGTCCCTGCAGTCAGAGTGTAAGGTCT GTATTTGCTGTTAATTGGATATCTTATCTTGCAAGT AAGGAAGGGATGGTCATTGCCTTGGTGGATGGTCG GGGAACAGCTTTCCAAGGTGACAAACTCCTGTATG CAGTGTATCGAAAGCTGGGTGTTTATGAAGTTGAA GACCAGATTACAGCTGTCAGAAAATTCATAGAAAT GGGTTTCATTGATGAAAAAAGAATAGCCATATGGG GCTGGTCCTATGGAGGATATGTTTCATCACTGGCC CTTGCATCTGGAACTGGTCTTTTCAAATGTGGGAT AGCAGTGGCTCCAGTCTCCAGCTGGGAATATTACG CGTCTGTCTACACAGAGAGATTCATGGGTCTCCCA ACAAAGGATGATAATCTTGAGCACTATAAGAATTC AACTGTGATGGCAAGAGCAGAATATTTCAGAAAT GTAGACTATCTTCTCATCCACGGAACAGCAGATGA TAATGTGCACTTTCAAAACTCAGCACAGATTGCTA AAGCTCTGGTTAATGCACAAGTGGATTTCCAGGCA ATGTGGTACTCTGACCAGAACCACGGCTTATCCGG CCTGTCCACGAACCACTTATACACCCACATGACCC ACTTCCTAAAGCAGTGTTTCTCTTTGTCAGACGGC AAAAAGAAAAAGAAAAAGGGCCACCACCATCACC ATCAC
28	CEA humano	UniProt n.º P06731
29	MCSP humano	UniProt n.º Q6UVK1
30	EGFR humano	UniProt n.º P00533
31	CD19 humano	UniProt n.º P15391

32	CD20 humano	UniProt n.º P11836
33	CD33 humano	UniProt n.º P20138
34	linfotoxina α humana	UniProt n.º P01374
35	TNF humano	UniProt n.º P01375
36	linfotoxina β humana	UniProt n.º Q06643
37	OX40L humano	UniProt n.º P23510
38	CD40L humano	UniProt n.º P29965
39	FasL humano	UniProt n.º P48023
40	CD27L humano	UniProt n.º P32970
41	CD30L humano	UniProt n.º P32971
42	4-1BBL humano	UniProt n.º P41273
43	TRAIL humano	UniProt n.º P50591
44	RANKE humano	UniProt n.º 014788
45	TWEAK humano	UniProt n.º 043508
46	APRIL humano	UniProt n.º 075888
47	BAFF humano	UniProt n.º Q9Y275
48	LIGHT humano	UniProt n.º 043557
49	TL1A humano	UniProt n.º 095150
50	GITRL humano	UniProt n.º Q9UNG2
51	ectodisplasina A humana	UniProt n.º Q92838
52	4-1BBL hu (50-254)	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL TQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
53	OX40L hu (51-183)	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMK VQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEP LFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSL DDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
54	OX40L hu (52-183)	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKV QNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPL FQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLD DFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
55	Conector peptídico $(SG4)_2$	SGGGGSGGGG
56	Conector peptídico $G4(SG4)_2$	GGGGSGGGGSGGGG
57	Conector peptídico	GSPGSSSSGS
58	Conector peptídico $(G4S)_4$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
59	Conector peptídico	GSGSGNGS
60	Conector peptídico	GGSGSGSG
61	Conector peptídico	GGSGSG
62	Conector peptídico	GGSG
63	Conector peptídico	GGSGNGSG
64	Conector peptídico	GGNGSGSG
65	Conector peptídico	GGNGSG
66	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CH1 cadena	Véase la tabla 2

	de botón Fc	
67	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CL1	Véase la tabla 2
68	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-FAP(28H1)	Véase la tabla 2
69	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-FAP (28H1)	Véase la tabla 2
70	4-1BBL murino (mu)	UniProt n.º Q3U1Z9-1
71	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL mu dimérico (104-309, C137,160,246S) - CH1 cadena de botón Fc	Véase la tabla 13
72	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL mu monomérico (104-309, C137,160,246S) - CL	Véase la tabla 13
73	Secuencia de nucleótidos, cadena KK Fc anti-FAP	Véase la tabla 13
74	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-FAP	Véase la tabla 13
75	4-1BBL mu dimérica (104-309, C137,160,246S) - CL cadena DD Fc	Véase la tabla 13
76	4-1BBL mu monomérico (104-309, C137,160,246S) - CL1	Véase la tabla 13
77	cadena KK Fc anti-FAP	Véase la tabla 13
78	cadena ligera anti-FAP	Véase la tabla 13
79	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc DP47	Véase la tabla 18
80	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera DP47	Véase la tabla 18
81	cadena de ojal Fc DP47	Véase la tabla 18
82	cadena ligera DP47	Véase la tabla 18
83	(kih) de Fc 4-1BB humano	Véase la tabla 31
84	(kih) de Fc 4-1BB de macaco cangrejero	Véase la tabla 31
85	(kih) de Fc 4-1BB murino	Véase la tabla 31
86	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc	Véase la tabla 32
87	Secuencia de nucleótidos, (kih) de Fc 4-1BB humano	Véase la tabla 32
88	Secuencia de nucleótidos, (kih) de Fc 4-1BB de macaco cangrejero	Véase la tabla 32
89	Secuencia de nucleótidos, (kih) de Fc 4-1BB murino	Véase la tabla 32
90	cadena de ojal Fc	Véase la tabla 32
91	(kih) de Fc 4-1BB humano	Véase la tabla 32
92	(kih) de Fc 4-1BB de macaco cangrejero	Véase la tabla 32
93	(kih) de Fc 4-1BB murino	Véase la tabla 32
94	Secuencia de nucleótidos, 4-1BB humano His	Véase la tabla 33
95	4-1BB humano His	Véase la tabla 33

96	4-1BBL humano (hu) (71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
97	4-1BBL hu dimérico (71-248) conectado mediante conector $(G4S)_2$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLG GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGL
98	4-1BBL hu dimérico (80-254) conectado mediante conector $(G4S)_2$	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSG GGGSDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
99	4-1BBL hu dimérico (52-254) conectado mediante conector $(G4S)_2$	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSG SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSPWAV SGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF AQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
100	CDR-H1 FAP(4B9)	SYAMS
101	CDR-H2 FAP(4B9)	AIIGSGASTYYADSVKG
102	CDR-H3 FAP(4B9)	GWFGGFNY
103	CDR-L1 FAP(4B9)	RASQSVTSSYLA
104	CDR-L2 FAP(4B9)	VGSRRAT
105	CDR-L3 FAP(4B9)	QQGIMLPPT
106	VH FAP(4B9)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNYWGQGTLVTVSS

107	VL FAP(4B9)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIK
108	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CH1* cadena de botón Fc	véase la tabla 4
109	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CL*	véase la tabla 4
110	4-1BBL hu monomérico (71-254)-(G4S)1 - CL*	véase la tabla 7
111	4-1BBL hu dimérico (52-254) - CH1* cadena de botón Fc	véase la tabla 10
112	4-1BBL hu monomérico (52-254) - CL*	véase la tabla 10
113	4-1BBL hu dimérico (80-254) - CH1* cadena de botón Fc	véase la tabla 11
114	4-1BBL hu monomérico (80-254) - CL*	véase la tabla 11
115	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
116	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
117	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 22
118	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1	véase la tabla 22
119	4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 24
120	4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1*	véase la tabla 24
121	cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1) fusionada con 4-1BBL dimérico (71-254)	véase la tabla 6
122	cadena de botón Fc anti-FAP (28H1) fusionada con 4-1BBL monomérico (71-254)	véase la tabla 6
123	cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL dimérico (71-254)	véase la tabla 23
124	cadena de botón Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL monomérico (71-254)	véase la tabla 23
125	cadena ligera anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21
126	cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL dimérico (71-248)	véase la tabla 26
127	cadena de botón Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL monomérico (71-248)	véase la tabla 26
128	Conector peptídico	GGGGS
129	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
130	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
131	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL	véase la tabla 4

	hu dimérico (71-254) - CH1* cadena de botón Fc	
132	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CL*	véase la tabla 4
133	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1) (VHCL)	véase la tabla 4
134	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-FAP (28H1) (VLCH1)	véase la tabla 4
135	cadena de ojal Fc anti-FAP (VHCL) (28H1)	véase la tabla 4
136	cadena ligera anti-FAP (VLCH1) (28H1)	véase la tabla 4
137	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1* cadena de botón Fc	véase la tabla 5
138	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL*	véase la tabla 5
139	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 5
140	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL*	véase la tabla 5
141	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1) fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-254)	véase la tabla 6
142	Secuencia de nucleótidos, cadena de botón Fc anti-FAP (28H1) fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-254)	véase la tabla 6
143	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) − $(G4S)_1$ - CL*	véase la tabla 7
144	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc [anti-FAP (28H1)]$_2$	véase la tabla 8
145	cadena de ojal Fc [anti-FAP (28H1)]$_2$	véase la tabla 8
146	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-254) - FAP (VHCL*) cadena de botón Fc	véase la tabla 9
147	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - FAP (VLCH1*)	véase la tabla 9
148	4-1BBL hu dimérico (71-254) - FAP (VHCL*) cadena de botón Fc	véase la tabla 9
149	4-1BBL hu monomérico (71-254)-FAP (VLCH1*)	véase la tabla 9
150	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (52-254) - CH1* cadena de botón Fc	véase la tabla 10
151	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (52-254) - CL*	véase la tabla 10
152	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (80-254) - CH1* cadena de botón Fc	véase la tabla 11
153	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (80-254) - CL*	véase la tabla 11
154	Secuencia de nucleótidos, cadena KK FC de DP47	véase la tabla 14

155	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera DP47	véase la tabla 14
156	cadena KK FC de DP47	véase la tabla 14
157	cadena ligera DP47	véase la tabla 14
158	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL mu dimérico (104-309, C160S) - CL cadena DD Fc	véase la tabla 15
159	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL murino monomérico (104-309, C160S) - CH1	véase la tabla 15
160	4-1BBL mu dimérico (104-309, C160S) - CL cadena DD Fc	véase la tabla 15
161	4-1BBL murino monomérico (104-309, C160S) - CH1	véase la tabla 15
162	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-FAP(4B9)	véase la tabla 21
163	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21
164	cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21
165	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 22
166	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1	véase la tabla 22
167	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-254)	véase la tabla 23
168	Secuencia de nucleótidos, cadena de botón Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-254)	véase la tabla 23
169	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-248)- CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 24
170	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1*	véase la tabla 24
171	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 25
172	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1	véase la tabla 25
173	4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 25
174	4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1	véase la tabla 25
175	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-248)	véase la tabla 26
176	Secuencia de nucleótidos, cadena de botón Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-248)	véase la tabla 26
177	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-254)	véase la tabla 27

178	Secuencia de nucleótidos, cadena de botón Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-254)	véase la tabla 27
179	cadena de ojal Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-254)	véase la tabla 27
180	cadena de botón Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-254)	véase la tabla 27
181	Secuencia de nucleótidos, cadena pesada DP47 (PGLALA hu IgG1)	véase la tabla 29
182	cadena pesada DP47 (PGLALA hu IgG1)	véase la tabla 29
183	4-1BBL hu monomérico (71-254) más conector $(G4S)_1$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGS
184	4-1BBL hu monomérico (71-248) más conector $(G4S)_2$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLG GGGSGGGGS
185	4-1BBL hu monomérico (71-248) más conector $(G4S)_1$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLG GGGS
186	Secuencia de nucleótidos, antígeno CD19 humano cadena de botón Fc marca avi	véase la tabla 43
187	Secuencia de polipéptidos, antígeno CD19 humano cadena de botón Fc marca avi	véase la tabla 43
188	Secuencia de nucleótidos, antígeno CD19 de macaco cangrejero cadena de botón Fc marca avi	véase la tabla 43
189	Secuencia de polipéptidos, antígeno CD19 de macaco cangrejero cadena de botón Fc marca avi	véase la tabla 43
190	HVR-L1 CD19 humanizado (8B8)	NSNGNT
191	HVR-H2 CD19 humanizado (8B8)	KFNG
192	HVR-H2 var.1 a 9 CD19 humanizado (8B8)	TEKFQGRVTM
193	HVR-L1 var.5 CD19 humanizado (8B8)	LENPNGNT
194	HVR-L1 var.9 CD19 humanizado (8B8)	LENPSGNT
195	CDR-H1 CD19 (8B8-018)	DYIMH
196	CDR-H2 CD19 (8B8-018)	YINPYNDGSKYTEKFQG
197	CDR-H3 CD19 (8B8-018)	GTYYYGSALFDY

198	CDR-L1 CD19 (8B8-018)	KSSQSLENPNGNTYLN
199	CDR-L2 CD19 (8B8-018)	RVSKRFS
200	CDR-L3 CD19 (8B8-018)	LQLTHVPYT
201	VH CD19 (8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWGQGTTVTVSS
202	VL CD19 (8B8-018)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNTYL NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIK
203	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
204	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
205	cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
206	cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
207	Secuencia de nucleótidos, cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 49
208	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 49
209	cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 49
210	ligando monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 49
211	Secuencia de nucleótidos, cadena de ligando dimérico (71- 248) de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 52
212	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico (71- 248) de botón Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 52
213	cadena de ligando dimérico (71-248) de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 52
214	ligando monomérico (71-248) de botón Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 52
215	Secuencia de nucleótidos, CD19 (8B8) VH clon original	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGT AAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGGCCTGCAAG GCTTCTGGATACACATTCACTGACTATATTATGCA CTGGGTGAAGCAGAAGACTGGGCAGGGCCTTGAG TGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTTCT AAGTACACTGAGAAGTTCAACGGCAAGGCCACAC TGACTTCAGACAAATCTTCCATCACAGCCTACATG GAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGT CTATTACTGTGCAAGAGGGACCTATTATTATGGTA GCGCCCTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACT CTCACAGTCTCCTCG

216	Secuencia de nucleótidos, CD19 (8B8) VL clon original	GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCC TGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCA GGTCTAGTCAGAGCCTTGAAAACAGTAATGGAAA CACCTATTTGAACTGGTACCTCCAGAAACCAGGCC AGTCTCCACAACTCCTGATCTACAGGGTTTCCAAA CGATTTTCTGGGGTCCTAGACAGGTTCAGTGGTAG TGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCA GAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTTCTGC CTACAACTTACACATGTCCCGTACACGTTCGGAGG GGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
217	aleatoria inversa L1 CD19	véase la tabla 53
218	aleatoria directa L2 CD19	véase la tabla 53
219	aleatoria inversa H1 CD19	véase la tabla 53
220	aleatoria directa H2 CD19	véase la tabla 53
221	constante inversa H3 CD19	véase la tabla 53
222	LMB3	véase la tabla 53
223	constante directa L1 D19	véase la tabla 54
224	aleatoria inversa L3 CD19	véase la tabla 54
225	constante directa L3 CD19	véase la tabla 54
226	aleatoria inversa H3 CD19	véase la tabla 54
227	Secuencia de nucleótidos, marca SNAP ECD CD19 humano -PDGFR	GGCCGCCGCTAGCGGCATCGACTACAAGGACGAC GATGACAAGGCCGGCATCGATGCCATCATGGACA AAGACTGCGAAATGAAGCGCACCACCCTGGATAG CCCTCTGGGCAAGCTGGAACTGTCTGGGTGCGAAC AGGGCCTGCACGAGATCAAGCTGCTGGGCAAAGG AACATCTGCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCCTGCCC CAGCCGCCGTGCTGGGCGGACCAGAGCCACTGAT

		GCAGGCCACCGCCTGGCTCAACGCCTACTTTCACC AGCCTGAGGCCATCGAGGAGTTCCCTGTGCCAGCC CTGCACCACCCAGTGTTCCAGCAGGAGAGCTTTAC CCGCCAGGTGCTGTGGAAACTGCTGAAAGTGGTGA AGTTCGGAGAGGTCATCAGCTACCAGCAGCTGGCC GCCCTGGCCGGCAATCCCGCCGCCACCGCCGCCGT GAAAACCGCCCTGAGCGGAAATCCCGTGCCCATTC TGATCCCCTGCCACCGGGTGGTGTCTAGCTCTGGC GCCGTGGGGGGCTACGAGGGCGGGCTCGCCGTGA AAGAGTGGCTGCTGGCCCACGAGGGCCACAGACT GGGCAAGCCTGGGCTGGGTGATATCCCCGAGGAA CCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGGCGACAATG CCGTGCTGCAGTGCCTGAAGGGCACCTCCGATGGC CCTACCCAGCAGCTGACCTGGTCCAGAGAGAGCCC CCTGAAGCCCTTCCTGAAGCTGTCTCTGGGCCTGC CTGGCCTGGGCATCCATATGAGGCCTCTGGCCATC TGGCTGTTCATCTTCAACGTGTCCCAGCAGATGGG CGGCTTCTACCTGTGTCAGCCTGGCCCCCCATCTG AGAAGGCTTGGCAGCCTGGCTGGACCGTGAACGT GGAAGGATCCGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACGTGT CCGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGAAGAA CAGATCTAGCGAGGGCCCCAGCAGCCCCAGCGGC AAACTGATGAGCCCCAAGCTGTACGTGTGGGCCAA GGACAGACCCGAGATCTGGGAGGGCGAGCCTCCT TGCCTGCCCCCTAGAGACAGCCTGAACCAGAGCCT GAGCCAGGACCTGACAATGGCCCCTGGCAGCACA CTGTGGCTGAGCTGTGGCGTGCCACCCGACTCTGT GTCTAGAGGCCCTCTGAGCTGGACCCACGTGCACC CTAAGGGCCCTAAGAGCCTGCTGAGCCTGGAACTG AAGGACGACAGGCCCGCCAGAGATATGTGGGTCA TGGAAACCGGCCTGCTGCTGCCTAGAGCCACAGCC CAGGATGCCGGCAAGTACTACTGCCACAGAGGCA ACCTGACCATGAGCTTCCACCTGGAAATCACCGCC AGACCCGTGCTGTGGCACTGGCTGCTGAGAACAGG CGGCTGGAAGGTCGACGAACAAAAACTCATCTCA GAAGAGGATCTGAATGCTGTGGGCCAGGACACGC AGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTT AAGGTGGTGGTGATCTCAGCCATCCTGGCCCTGGT GGTGCTCACCATCATCTCCCTTATCATCCTCATCAT GCTTTGGCAGAAGAAGCCACGT
228	Secuencia de nucleótidos, marca SNAP ECD CD19 de macaco cangrejero-PDGFR	CCGGCCGCCGCTAGCGGCATCGACTACAAGGACG ACGATGACAAGGCCGGCATCGATGCCATCATGGA CAAAGACTGCGAAATGAAGCGCACCACCCTGGAT AGCCCTCTGGGCAAGCTGGAACTGTCTGGGTGCGA ACAGGGCCTGCACGAGATCAAGCTGCTGGGCAAA GGAACATCTGCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCCTGC CCCAGCCGCCGTGCTGGGCGGACCAGAGCCACTG ATGCAGGCCACCGCCTGGCTCAACGCCTACTTTCA CCAGCCTGAGGCCATCGAGGAGTTCCCTGTGCCAG CCCTGCACCACCCAGTGTTCCAGCAGGAGAGCTTT ACCCGCCAGGTGCTGTGGAAACTGCTGAAAGTGGT GAAGTTCGGAGAGGTCATCAGCTACCAGCAGCTG

		GCCGCCCTGGCCGGCAATCCCGCCGCCACCGCCGC CGTGAAAACCGCCCTGAGCGGAAATCCCGTGCCCA TTCTGATCCCCTGCCACCGGGTGGTGTCTAGCTCTG GCGCCGTGGGGGGCTACGAGGGCGGGCTCGCCGT GAAAGAGTGGCTGCTGGCCCACGAGGGCCACAGA CTGGGCAAGCCTGGGCTGGGTGATATCCCCCAGGA ACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGGCGACAAT GCCGTGCTCCAGTGTCTCGAGGGCACCTCCGATGG CCCTACACAGCAGCTCGTGTGGTGCAGAGACAGCC CCTTCGAGCCCTTCCTGAACCTGTCTCTGGGCCTGC CTGGCATGGGCATCAGAATGGGCCCTCTGGGCATC TGGCTGCTGATCTTCAACGTGTCCAACCAGACCGG CGGCTTCTACCTGTGTCAGCCTGGCCTGCCAAGCG AGAAGGCTTGGCAGCCTGGATGGACCGTGTCCGTG GAAGGATCTGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACGTGTC CGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGAAGAAC AGAAGCAGCGAGGGCCCTAGCAGCCCCAGCGGCA AGCTGAATAGCAGCCAGCTGTACGTGTGGGCCAA GGACAGACCCGAGATGTGGGAGGGCGAGCCTGTG TGTGGCCCCCCTAGAGATAGCCTGAACCAGAGCCT GAGCCAGGACCTGACAATGGCCCCTGGCAGCACA CTGTGGCTGAGCTGTGGCGTGCCACCCGACTCTGT GTCCAGAGGCCCTCTGAGCTGGACACACGTGCGGC CTAAGGGCCCTAAGAGCAGCCTGCTGAGCCTGGA ACTGAAGGACGACCGGCCCGACCGGGATATGTGG GTGGTGGATACAGGCCTGCTGCTGACCAGAGCCAC AGCCCAGGATGCCGGCAAGTACTACTGCCACAGA GGCAACTGGACCAAGAGCTTTTACCTGGAAATCAC CGCCAGACCCGCCCTGTGGCACTGGCTGCTGAGAA TCGGAGGCTGGAAGGTCGACGAGCAGAAGCTGAT CTCCGAAGAGGACCTGAACGCCGTGGGCCAGGAT ACCCAGGAAGTGATCGTGGTGCCCCACAGCCTGCC CTTCAAGGTGGTCGTGATCAGCGCCATTCTGGCCC TGGTGGTGCTGACCATCATCAGCCTGATCATCCTG ATTATGCTGTGGCAGAAAAAGCCCCGC
229	Secuencia de polipéptidos marca SNAP ECD CD19 humano-PDGFR	PAAASGIDYKDDDDKAGIDAIMDKDCEMKRTTLDSP LGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAA VLGGPEPLMQATAWLNAYFHQPEAIEEFPVPALHHP VFQQESFTRQVLWKLLKVVKFGEVISYQQLAALAGN PAATAAVKTALSGNPVPILIPCHRVVSSSGAVGGYEG GLAVKEWLLAHEGHRLGKPGLGDIPEEPLVVKVEEG DNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLG LPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSE KAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKN RSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLP PRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPL SWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVMETGLL LPRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFHLEITARPVLWH WLLRTGGWKVDEQKLISEEDLNAVGQDTQEVIVVP HSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR

230	Secuencia de polipéptidos marca SNAP ECD CD19 de macaco cangrejero-PDGFR	PAAASGIDYKDDDDKAGIDAIMDKDCEMKRTTLDSP LGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAA VLGGPEPLMQATAWLNAYFHQPEAIEEFPVPALHHP VFQQESFTRQVLWKLLKVVKFGEVISYQQLAALAGN PAATAAVKTALSGNPVPILIPCHRVVSSSGAVGGYEG GLAVKEWLLAHEGHRLGKPGLGDIPQEPLVVKVEEG DNAVLQCLEGTSDGPTQQLVWCRDSPFEPFLNLSLG LPGMGIRMGPLGIWLLIFNVSNQTGGFYLCQPGLPSE KAWQPGWTVSVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKN RSSEGPSSPSGKLNSSQLYVWAKDRPEMWEGEPVCG PPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGP LSWTHVRPKGPKSSLLSLELKDDRPDRDMWVVDTG LLLTRATAQDAGKYYCHRGNWTKSFYLEITARPAL WHWLLRIGGWKVDEQKLISEEDLNAVGQDTQEVIV VPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR
231	CDR-L1 CD19 (8B8-5H09)	véase la tabla 56
232	CDR-L2 CD19 (8B8-5H09)	véase la tabla 56
233	CDR-L3 CD19 (8B8-5H09)	véase la tabla 56
234	CDR-H1 CD19 (8B8-5H09)	véase la tabla 57
235	CDR-H2 CD19 (8B8-5H09)	véase la tabla 57
236	CDR-H3 CD19 (8B8-5H09)	véase la tabla 57
237	CDR-L1 CD19 (8B8-7H07)	véase la tabla 56
238	CDR-L2 CD19 (8B8-7H07)	véase la tabla 56
239	CDR-L3 CD19 (8B8-7H07)	véase la tabla 56
240	CDR-H1 CD19 (8B8-7H07)	véase la tabla 57
241	CDR-H2 CD19 (8B8-7H07)	véase la tabla 57
242	CDR-H3 CD19 (8B8-7H07)	véase la tabla 57
243	CDR-L1 CD19 (8B8-2B03)	véase la tabla 56
244	CDR-L2 CD19 (8B8-2B03)	véase la tabla 56
245	CDR-L3 CD19 (8B8-2B03)	véase la tabla 56
246	CDR-H1 CD19 (8B8-2B03)	véase la tabla 57
247	CDR-H2 CD19 (8B8-2B03)	véase la tabla 57
248	CDR-H3 CD19 (8B8-2B03)	véase la tabla 57
249	CDR-L1 CD19 (8B8-2B11)	véase la tabla 56
250	CDR-L2 CD19 (8B8-2B11)	véase la tabla 56
251	CDR-L3 CD19 (8B8-2B11)	véase la tabla 56
252	CDR-H1 CD19 (8B8-2B11)	véase la tabla 57
253	CDR-H2 CD19 (8B8-2B11)	véase la tabla 57
254	CDR-H3 CD19 (8B8-2B11)	véase la tabla 57
255	CDR-L1 CD19 (8B8-5A07)	véase la tabla 56
256	CDR-L2 CD19 (8B8-5A07)	véase la tabla 56
257	CDR-L3 CD19 (8B8-5A07)	véase la tabla 56
258	CDR-H1 CD19 (8B8-5A07)	véase la tabla 57
259	CDR-H2 CD19 (8B8-5A07)	véase la tabla 57
260	CDR-H3 CD19 (8B8-5A07)	véase la tabla 57

261	CDR-L1 CD19 (8B8-5B08)	véase la tabla 56
262	CDR-L2 CD19 (8B8-5B08)	véase la tabla 56
263	CDR-L3 CD19 (8B8-5B08)	véase la tabla 56
264	CDR-H1 CD19 (8B8-5B08)	véase la tabla 57
265	CDR-H2 CD19 (8B8-5B08)	véase la tabla 57
266	CDR-H3 CD19 (8B8-5B08)	véase la tabla 57
267	CDR-L1 CD19 (8B8-5D08)	véase la tabla 56
268	CDR-L2 CD19 (8B8-5D08)	véase la tabla 56
269	CDR-L3 CD19 (8B8-5D08)	véase la tabla 56
270	CDR-H1 CD19 (8B8-5D08)	véase la tabla 57
271	CDR-H2 CD19 (8B8-5D08)	véase la tabla 57
272	CDR-H3 CD19 (8B8-5D08)	véase la tabla 57
273	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera original CD19 (8B8)	véase la tabla 58
274	Secuencia de nucleótidos, cadena pesada original CD19 (8B8)	véase la tabla 58
275	cadena ligera original CD19 (8B8)	véase la tabla 58
276	cadena pesada original CD19 (8B8)	véase la tabla 58
277	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera CD19 (8B8-2B11)	véase la tabla 59
278	Secuencia de nucleótidos, cadena pesada CD19 (8B8-2B11)	véase la tabla 59
279	cadena ligera CD19 (8B8-2B11)	véase la tabla 59
280	cadena pesada CD19 (8B8-2B11)	véase la tabla 59
281	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera CD19 (8B8-7H07)	véase la tabla 59
282	Secuencia de nucleótidos, cadena pesada CD19 (8B8-7H07)	véase la tabla 59
283	cadena ligera CD19 (8B8-7H07)	véase la tabla 59
284	cadena pesada CD19 (8B8-7H07)	véase la tabla 59
285	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera CD19 (8B8-2B03)	véase la tabla 59
286	Secuencia de nucleótidos, cadena pesada CD19 (8B8-2B03)	véase la tabla 59
287	cadena ligera CD19(8B8-2B03)	véase la tabla 59
288	cadena pesada CD19 (8B8-2B03)	véase la tabla 59
289	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera CD19 (8B8-5A07)	véase la tabla 59
290	Secuencia de nucleótidos, cadena pesada CD19 (8B8-5A07)	véase la tabla 59
291	cadena ligera CD19 (8B8-5A07)	véase la tabla 59
292	cadena pesada CD19 (8B8-5A07)	véase la tabla 59
293	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera CD19 (8B8-5D08)	véase la tabla 59
294	Secuencia de nucleótidos, cadena pesada CD19 (8B8-5D08)	véase la tabla 59
295	cadena ligera CD19 (8B8-5D08)	véase la tabla 59
296	cadena pesada CD19 (8B8-5D08)	véase la tabla 59
297	Secuencia de nucleótidos, cadena	véase la tabla 59

	ligera CD19 (8B8-5B08)	
298	Secuencia de nucleótidos, cadena pesada CD19 (8B8-5B08)	véase la tabla 59
299	cadena ligera CD19 (8B8-5B08)	véase la tabla 59
300	cadena pesada CD19 (8B8-5B08)	véase la tabla 59
301	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera CD19 (8B8-5H09)	véase la tabla 59
302	Secuencia de nucleótidos, cadena pesada CD19 (8B8-5H09)	véase la tabla 59
303	cadena ligera CD19 (8B8-5H09)	véase la tabla 59
304	cadena pesada CD19 (8B8-5H09)	véase la tabla 59
305	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 62
306	cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 62
307	Secuencia de nucleótidos, cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 64
308	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 64
309	cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 64
310	ligando monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 64
311	Secuencia de nucleótidos, cadena de ligando dimérico (71- 248) de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 67
312	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico (71- 248) de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 67
313	cadena de ligando dimérico (71-248) de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 67
314	ligando monomérico (71-248) de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 67
315	Secuencia de nucleótidos, cadena pesada CD19(8B8-018) (PGLALA huIgG1)	véase la tabla 72
316	cadena pesada CD19(8B8-018) (PGLALA huIgG1)	véase la tabla 72
317	VH T84.66 anti-mu CEA	MKCSWVIFFL MAVVTGVNSE VQLQQSGAEL VEPGASVKLS CTASGFNIKD TYMHWVKQRP EQGLEWIGRI DPANGNSKYV PKFQGKATIT ADTSSNTAYL QLTSLTSEDT AVYYCAPFGY YVSDYAMAYW GQGTSVTVSS
318	VL T84.66 anti-mu CEA	METDTLLLWV LLLWVPGSTG DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT MSCRAGESVD IFGVGFLHWY QQKPGQPPKL LIYRASNLES GIPVRFSGTG SRTDFTLIID PVEADDVATY YCQQTNEDPY TFGGGTKLEI K

319	IGHV1-69*08 N.º de acc. IMGT Z14309	TAAGGGGCTT CCTAGTCCTA AGGCTGAGGA AGGGATCCTG GTTTAGTTAA AGAGGATTTT ATTCACCCCT GTGTCCTCTC CACAGGTGTC CAGTCCCAGG TCCAGCTGGT GCAATCTGGG GCTGAGGTGA AGAAGCCTGG GTCCTCGGTG AAGGTCTCCT GCAAGGCTTC TGGAGGCACC TTCAGCAGCT ATACTATCAG CTGGGTGCGA CAGGCCCCTG GACAAGGGCT TGAGTGGATG GGAAGGATCA TCCCTATCCT TGGTACAGCA AACTACGCAC AGAAGTTCCA GGGCAGAGTC ACGATTACCG CGGACAAATC CACGAGCACA GCCTACATGG AGCTGAGCAG CCTGAGATCT GAGGACACGG CCGTGTATTA CTGTGCGAGA GA
320	IGKV3-11*01 N.º de acc. IMGT	CTGCAGCTGG AAGCTCAGCT CCCACCCAGC TGCTTTGCAT GTCCCTCCCA GCTGCCCTAC CTTCCAGAGC CCATATCAAT GCCTGTGTCA GAGCCCTGGG GAGGAACTGC TCAGTTAGGA CCCAGAGGGA ACCATGGAAG CCCCAGCTCA GCTTCTCTTC CTCCTGCTAC TCTGGCTCCC AGGTGAGGGG AACATGAGGT GGTTTTGCAC ATTAGTGAAA ACTCTTGCCA CCTCTGCTCA GCAAGAAATA TAATTAAAAT TCAAAGTATA TCAACAATTT TGGCTCTACT CAAAGACAGT TGGTTTGATC TTGATTACAT GAGTGCATTT CTGTTTTATT TCCAATTTCA GATACCACCG GAGAAATTGT GTTGACACAG TCTCCAGCCA CCCTGTCTTT GTCTCCAGGG GAAAGAGCCA CCCTCTCCTG CAGGGCCAGT CAGAGTGTTA GCAGCTACTT AGCCTGGTAC CAACAGAAAC CTGGCCAGGC TCCCAGGCTC CTCATCTATG ATGCATCCAA CAGGGCCACT GGCATCCCAG CCAGGTTCAG TGGCAGTGGG TCTGGGACAG ACTTCACTCT CACCATCAGC AGCCTAGAGC CTGAAGATTT TGCAGTTTAT TACTGTCAGC AGCGTAGCAA CTGGCCTCCC ACAGTGATTC CACATGAAAC AAAAACCCCA ACAAGACCAT CAGTGTTTAC TAGATTATTA TACCAGCTGC TTCCTTTACA GACAGCTAGT GGGGTGGCCA CTCAGTGTTA GCATCTCAGC TCTATTTGGC CATTTTGGAG TTCAAGT
321	CDR-H1 CEA	véase la tabla 81
322	CDR-H2 CEA	véase la tabla 81
323	CDR-H3 CEA	véase la tabla 81
324	CDR-L1 CEA	véase la tabla 81
325	CDR-L2 CEA	véase la tabla 81
326	CDR-L3 CEA	véase la tabla 81
327	VH de aglutinante de CEA original	véase la tabla 81
328	VL de aglutinante de CEA original	véase la tabla 81
329	VH de aglutinante de CEA humanizado	véase la tabla 81
330	VL de aglutinante de CEA humanizado	véase la tabla 81

331	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 82
332	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 82
333	cadena de ojal Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 82
334	cadena ligera anti-CEA (T84.66-LCHA)	véase la tabla 82
335	Secuencia de nucleótidos, cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 84
336	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico de botón Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 84
337	Cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 84
338	Ligando monomérico de botón Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 84
339	Secuencia de nucleótidos, cadena de ligando dimérico (71-248) de ojal Fc anti-CEA (T84.66-LCHA)	véase la tabla 87
340	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico (71- 248) de botón Fc anti-CEA (T84.66-LCHA)	véase la tabla 87
341	cadena de ligando dimérico (71-248) de ojal Fc anti-CEA (T84.66-LCHA)	véase la tabla 87
342	Ligando monomérico (71- 248) de botón Fc anti-CEA (T84.66-LCHA)	véase la tabla 87
343	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CEA(T84.66)	véase la tabla 88
344	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CEA(T84.66)	véase la tabla 88
345	cadena de ojal Fc anti-CEA (T84.66)	véase la tabla 88
346	cadena ligera anti-CEA (T84.66)	véase la tabla 88
347	Secuencia de nucleótidos, cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CEA(T84.66)	véase la tabla 89
348	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico de botón Fc anti-CEA(T84.66)	véase la tabla 89
349	cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CEA(T84.66)	véase la tabla 89
350	ligando monomérico de botón Fc anti-CEA(T84.66)	véase la tabla 89
351	Secuencia de nucleótidos, NA3B3A2 hu-avi His	véase la tabla 92
352	NA3B3 A2 humano-avi-His	véase la tabla 92
353	Secuencia de nucleótidos, OX40L hu dimérico (51-183) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 97
354	Secuencia de nucleótidos, OX40L hu monomérico (51-183) - CH1*	véase la tabla 97
355	OX40L hu dimérico (51-183) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 97
356	OX40L hu monomérico (51-183) -	véase la tabla 97

	CH1*	
357	VH CD19 (8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP QLFDYWGQGTTVTVSS
358	VL CD19 (8B8-2B11)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYL NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCLQLLEDPYTFGQGTKLEIK
359	VH CD19 (8B8-7H07)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ELFDYWGQGTTVTVSS
360	VL CD19 (8B8-7H07)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYL NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCLQATHIPYTFGQGTKLEIK
361	VH CD19 (8B8-2B03)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYITH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP DLFDYWGQGTTVTVSS
362	VL CD19 (8B8-2B03)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYL NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGXKLEIK
363	VH CD19 (8B8-5A07)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWGQGTTVTVSS
364	VL CD19 (8B8-5A07)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYL NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCLQPGHYPGTFGQGTKLEIK
365	VH CD19 (8B8-5D08)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ELFDYWGQGTTVTVSS
366	VL CD19 (8B8-5D08)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYL NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHEPYTFGQGTKLEIK
367	VH CD19 (8B8-5B08)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP QLFDYWGQGTTVTVSS
368	VL CD19 (8B8-5B08)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYL NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCLQLDSYPNTFGQGTKLEIK
369	VH CD19 (8B8-5H09)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWGQGTTVTVSS
370	VL CD19 (8B8-5H09)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLESSTGNTYL NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCLQLIDYPVTFGQGTKLEIK

371	OX40L hu dimérico (51-183) conectado por conector (G4S)2	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMK VQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEP LFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSL DDFHVNGGELILIHQNPGEFCVLGGGGSGGGGSQVS HRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQN NSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQ LKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDF HVNGGELILIHQNPGEFCVL
372	OX40L hu dimérico (52-183) conectado por conector (G4S)2	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKV QNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPL FQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLD DFHVNGGELILIHQNPGEFCVLGGGGSGGGGSVSHR YPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNS VIINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLK KVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHV NGGELILIHQNPGEFCVL
373	4-1BBL hu (85-248)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
374	4-1BBL hu (80-248)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
375	4-1BBL hu (52-248)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSG SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGL

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 EU de acuerdo con Kabat (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 de los NIH n.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

Se determinaron secuencias de ADN por secuenciación de doble hebra.

Síntesis génica

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 que se origina en el tejido apropiado. Se clonaron los 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 se dirige a proteínas para su secreción en células eucariotas.

Técnicas de cultivo celular

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.

Purificacion de proteinas

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 pH2,8 seguido de neutralización inmediata de la muestra. La proteína agregada se separaró de los anticuerpos monoméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200; GE Healthcare) en PBS o en histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH6,0. 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 (CET) o espectrometría de masas.

SDS-page

El sistema de gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen Corp.) se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se usó un 10 % o un 4-12 % de geles NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH6,4) 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

Se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño (CET) 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, KH_2PO_4/K_2HPO_4 50 mM, pH7,5 en un sistema Agilent HPLC1100 o en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en PBS2 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 de VH/VL (VH/VL CrossMabs) con hincapié en su correcto ensamblaje. Las estructuras primarias esperadas se analizaron mediante espectrometría de masas con ionización por electronebulización (EM-IEN) 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 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 pH8 a temperatura ambiente durante 120 horas y a 37 °C durante 40 min, respectivamente. Antes de la espectrometría de masas, las muestras se desalaron por medio de HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa total se determinó por medio de EM-IEN en un sistema de EM maXis 4G UHR-QTOF (Bruker Daltonik) equipado con una fuente TriVersa NanoMate (Advion).

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

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 la afinidad se inmovilizan anticuerpos de cabra contra IgG humana, JIR109-005-098, 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 (HEPES10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.005 %, pH7,4), a 25 °C (o de forma alternativa a 37 °C). Se añadió antígeno (R&D Systems o se purificó 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 tampón) se restan de las curvas de muestra para la correccion de la deriva intrínseca respecto al valor de referencia del sistema y para la reducción de la señal-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

1.1 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando de 4-1BB humano dirigido

Se sintetizaron diferentes fragmentos de la secuencia de ADN que codifica parte del ectodominio (aminoácidos 71-254, 52-254 y 80-254) del ligando 4-1BB humano de acuerdo con la secuencia P41273 de la base de datos Uniprot (SEQ ID NO: 42).

Como componentes para el ensamblaje de una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de TNF, se clonó un polipéptido que comprende dos ectodominios del ligando 4-1BB, separados por conectores $(G4S)_2$, y se fusionó con el dominio IgG1-CH1 o CL humano, como se representa en la figura 1A (ligando 4-1BB humano, conector $(G_4S)_2$, ligando 4-1BB humano, conector $(G_4S)_2$, CH1 o CL humano) o como se representa en la figura 1C (CH3 humano, conector $(G_4S)_2$, ligando 4-1BB humano, conector $(G_4S)_2$, ligando 4-1BB humano).

Se clonó un polipéptido que comprendía un ectodominio del ligando 4-1BB y se fusionó con el dominio IgG1-CL o CH1 humano, como se describe en la figura 1B (ligando 4-1BB humano, conector $(G_4S)_2$, CL o CH1 humano) o como se representa en la figura 1D (CH3 humano, conector $(G_4S)_2$, ligando 4-1BB humano).

Los polipéptidos se subclonaron sin cambio de pauta de lectura con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana con conectores peptídicos opcionales, por ejemplo, para la construcción 1, el polipéptido que codifica el ligando dimérico 4-1BB fusionado con un dominio CH1 humano se subclonó sin cambio de pauta de lectura con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant, Zhu et al. 1998) usando un conector $(G_4S)_2$ de SEQ ID NO: 13 o $(GSPGSSSSGS)$ de SEQ ID NO: 57.

La región variable de secuencias de ADN de cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para la proteína de activación de fibroblastos (FAP), es decir, 28H1, se subclonó sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal (Carter, J. Immunol. Methods (2001), 248, 7-15) o la cadena ligera constante de IgG1 humana. La generación y preparación de los aglutinantes de FAP se describe en el documento WO 2012/020006 A2, que se incorpora en el presente documento como referencia.

La tabla 1 resume las características de las construcciones producidas. Las construcciones 1 a 10 difieren en su geometría, valencia para FAP, ectodominio del ligando 4-1BB, entrecruzamiento del dominio CH1 y CL (tecnología CrossMab), mutaciones en los dominios CH1 y CL y diferentes conectores peptídicos en el polipéptido que comprende un ectodominio de ligando 4-1BB (cadena de 4-1BBL monomérico).

Tabla 1: Características de moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de TNF producidas (trímeros 4-1BBL divididos de FAP)

Construcción	Valencia para FAP	Aglutinante de FAP	Ectodominio de 4-1BBL	Dominios CH1-CL cruzados	Residuos cargados	Conector a 4-1BBL en la cadena ligera
1.1	monovalente	28H1	71-254	no	no	(G4S)2
1.2	monovalente	28H1	71-254	sí (ligando)	sí (ligando)	(G4S)2
1.3	monovalente	28H1	71-254	sí (Fab FAP)	sí (ligando)	(G4S)2
1.4	monovalente	28H1	71-254	no	sí (ligando)	(G4S)2
1.5	bivalente	28H1	71-254	no	no	(G4S)2
1.6	monovalente	28H1	71-254	no	sí (ligando)	(G4S)1
1.7	bivalente	28H1	71-254	sí (ligando)	sí (ligando)	(G4S)2

1.8	bivalente	28H1	71-254	sí (Fab FAP fusionado al ligando)	sí (ligando)	(G4S)2
1.9	monovalente	28H1	52-254	no	sí (ligando)	(G4S)2
1.10	monovalente	28H1	80-254	no	sí (ligando)	(G4S)2

Para evitar emparejamientos incorrectos, en la mayoría de las construcciones se reemplazó un par de dominios CH1 y CL entre sí (entrecruzamiento de dominios) como se describe en el documento WO 2009/080253 A1.

Para mejorar aún más el emparejamiento correcto, se introdujeron diferentes sustituciones aminoacídicas cargadas en los dominios CH1 y CL cruzados o no cruzados como residuos cargados en las construcciones 2 a 4 y 6 a 10. En el dominio CL humano se introdujeron las mutaciones E123R y Q124K, mientras que las mutaciones K147E y K213E se clonaron en el dominio CH1 humano.

Para todas las construcciones, se usó tecnología de heterodimerización de botones en ojales con las mutaciones S354C/T366W en el dominio CH3 de la cadena de botón y las correspondientes mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V en el dominio CH3 de la cadena de ojal (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

Se han introducido 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 la publicación de patente internacional n.º WO 2012/130831 A1.

Por ejemplo, en la construcción 1, la combinación de la cadena de botón ligando-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W en el primer dominio CH3, con la cadena de ojal anti-FAP-Fc dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V en el segundo dominio CH3 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y una Fab de unión a FAP (figura 2, gráfico 1.1).

La tabla 2 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP monovalente (construcción 1.1).

Tabla 2: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB humano dirigido a FAP, construcción 1.1

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
66	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CH1 cadena de botón Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG

		TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCA GCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCA GCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCT GAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCC TGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAA CTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTT CAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTC AGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCG CTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGA CCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCT TCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGAC AGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCC CGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTG GGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTG CCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGAAGCGGAG GGGGAGGAAGTGCTAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTC CCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCACAAGTGGAGGAAC AGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA GCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCTGACAAG CGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCG GCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCTA GCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGA ACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTG CCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCTTCCGTGTTCCT GTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCC GGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCC ACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGAC GGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT AAA

67	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CL	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGT TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAA AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGT

68	cadena de ojal Fc anti-FAP	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCA GCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGG CTTCACCTTCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACA GGCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTG GGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGG GCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCC TGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTC GACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAG CGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCC CAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCG TGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCAC ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGC CTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCT GCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
69	cadena ligera anti-FAP	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGGCACCCTGTCTCTG AGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTC CCAGTCCGTGTCCCGGTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCA GAAGCCCGGCCAGGCCCCTCGGCTGCTGATCATCGGCG CCTCTACCAGAGCCACCGGCATCCCTGACCGGTTCTCCG GCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCC GGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGC AGGGCCAGGTCATCCCTCCCACCTTTGGCCAGGGCACCA AGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCT TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

14	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CH1 cadena de botón Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPEL SPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNS AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CL1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	cadena de ojal Fc anti-FAP(28H1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQA PGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
19	cadena ligera anti-FAP(28H1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKP GQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC

La tabla 3 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP monovalente (construcción 1.2) con entrecruzamiento CH1-CL y residuos cargados.

Tabla 3: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB humano dirigido a FAP, construcción 1.2

129	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCA GCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCA GCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCT GAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCC TGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAA CTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTT CAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTC AGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCG CTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGA CCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCT TCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGAC AGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCC CGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTG GGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTG CCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGTTCCGGAGG GGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTAT

		CTTCCCACCCAGCGACCGGAAGCTGAAGTCTGGCACAG CCAGCGTCGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCCGCG AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACA GCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGC CTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGAC CAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACAAGACCCACA CCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCC CTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCC TGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGG TGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATT GGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACC AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGT GGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA
130	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCCGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCCAGGCACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGCCTGCCTAGC CCTAGATCTGAAGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGG ATCTGCTAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCC TGGGCTGCCTGGTGGAAGATTACTTCCCCGAGCCCGTGA CCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGC ACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACT CTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAACCCAAGTC CTGC
68	cadena de ojal Fc anti-FAP	Véase la tabla 2
69	cadena ligera anti-FAP	Véase la tabla 2

115	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPEL SPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNS AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFP PSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
116	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDEKVEPKSC
18	cadena de ojal Fc anti-FAP(28H1)	Véase la tabla 2
19	cadena ligera anti-FAP(28H1)	Véase la tabla 2

La tabla 4 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP monovalente, construcción 1.3 (trímero dividido de FAP con entrecruzamiento CH1-CL en Fab anti-FAP y residuos cargados en las cadenas que contienen 4-1BBL).

Tabla 4: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB humanodirigido a FAP, construcción 1.3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
131	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CH1* cadena de botón Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCA GCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCA GCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCT GAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCC TGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAA CTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTT CAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTC AGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCG CTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGA CCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCT TCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGAC AGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCC CGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTG GGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTG CCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGAAGCGGAG GGGGAGGAAGTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTC CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCAC AGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCGAGGACTACTTCCCCGA GCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTC CGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGG CCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGT GCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCC

		CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTG GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAA
132	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CL*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATCGGAAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGT TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAA AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGT
133	cadena de ojal Fc anti-FAP (VHCL) (28H1)	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCA GCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGG CTTCACCTTCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACA GGCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTG GGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGG GCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCC TGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTC GACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAG CGCTAGCGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCACC CAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCCAGCGTGG TGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGG TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGG CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTG ACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACCGGGGCGAGTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCC TTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCTTCCGTGTT

		CCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAG CCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTC CCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGG ACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCA GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGT GAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA
134	cadena ligera anti-FAP (VLCH1) (28H1)	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGAGCCTG AGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCAG CCAGAGCGTGAGCCGGAGCTACCTGGCCTGGTATCAGC AGAAGCCCGGCCAGGCCCCCAGACTGCTGATCATCGGC GCCAGCACCCGGGCCACCGGCATCCCCGATAGATTCAG CGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAG CCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCA GCAGGGCCAGGTGATCCCCCCCACCTTCGGCCAGGGCA CCAAGGTGGAAATCAAGAGCAGCGCTTCCACCAAAGGC CCTTCCGTGTTTCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCT CTGGAGGCACCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATT ATTTTCCTGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAATAGCGGAG CACTGACCTCTGGAGTGCATACTTTCCCCGCTGTGCTGC AGTCCTCTGGACTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAG TGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT
108	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CH1* cadena de botón Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPEL SPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNS AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

109	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CL*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAP SVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
135	cadena de ojal Fc anti-FAP (VHCL) (28H1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQA PGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSAS VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
136	cadena ligera anti-FAP (VLCH1) (28H1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKP GQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSC

La tabla 5 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP monovalente, construcción 1.4 (trímero dividido de FAP con Fab anti-FAP, ligando 4-1BB monomérico fusionado con la cadena de botón CH1 y residuos cargados en las cadenas que contienen 4-1BBL).

Tabla 5: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB humano dirigido a FAP, construcción 1.4

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
137	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1* cadena de botón Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCCGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACT

		GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCCAGGCACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGCCTGCCTAGC CCTAGATCTGAAGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGG ATCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGC CCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTC TGGGCTGCCTGGTCGAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGA CCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGC ACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATA GCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAGCCCAAGA GCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCA CCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
138	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCA GCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCA GCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCT GAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCC TGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAA CTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTT CAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTC AGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCG CTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGA

		CCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCT TCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGAC AGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCC CGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTG GGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTG CCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGTTCCGGAGG GGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCCGCCATCTGATCGGAAGTTGAAATCTGGAACTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCT GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
68	cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1)	véase la tabla 2
69	cadena ligera anti-FAP(28H1)	Véase la tabla 2
139	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPEL SPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNS AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
140	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPEL SPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNS AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFP PSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
18	cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1)	véase la tabla 2
19	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2

La tabla 6 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP bivalente, construcción 1.5 (trímero dividido de FAP con 2 Fabs anti-FAP, ligando 4-1BB dimérico y monomérico fusionado con el extremo C de cada cadena pesada, respectivamente).

Tabla 6: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB humano dirigido a FAP, construcción 1.5

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
141	cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1) fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-254)	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCA GCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGG CTTCACCTTCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACA GGCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTG GGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGG GCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCC TGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTC GACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAG CGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCC CAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCG TGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCAC ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGC CTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCT GCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA

		GAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCG GAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTG AGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAG GGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTG ATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTG GCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGA GGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGG CCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATC TGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCC GGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACC TGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACA GAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGG CGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGAT TCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAG GCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAA CTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGA CAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTG CTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGG CTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAA GAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGT GTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGT GGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCA TCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACT GGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGC CAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGC ATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCAT ACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCA GGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGA GATCCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
142	cadena de botón Fc anti-FAP (28H1) fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-254)	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCA GCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGG CTTCACCTTCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACA GGCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTG GGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGG GCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCC TGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTC GACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAG CGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT

		GTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCT ACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGC CAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGAC CGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGG CGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAG CTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGG CAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTG CTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGA CTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAA AGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCG TGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGG TGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGC ATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTC TGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGG CCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGC ACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCAC ACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACA GGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCG AGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
69	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2
121	cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1) fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQA PGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEG GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

122	cadena de botón Fc anti-FAP (28H1) fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQA PGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
19	cadena ligera anti-FAP(28H1)	Véase la tabla 2

La tabla 7 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP monovalente, construcción 1.6 (trímero dividido de FAP con Fab anti-FAP, ligando 4-1BB monomérico fusionado con CL* por medio de un conector (G4S)).

Tabla 7: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB humano dirigido a FAP, construcción 1.6

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
131	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CH1* cadena de botón Fc	Véase la tabla 4
143	4-1BBL hu monomérico (71-254) - $(G4S)_1$ - CL*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTCGTACGGTGGC TGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATCGGAA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGG TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCT CAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
68	cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1)	véase la tabla 2
69	cadena ligera	véase la tabla 2

	anti-FAP(28H1)	
108	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CH1* cadena de botón Fc	véase la tabla 4
110	4-1BBL hu monomérico (71-254) - $(G4S)_1$ - CL*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSRTVAAPSVFIFP PSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
18	cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1)	véase la tabla 2
19	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2

La tabla 8 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP bivalente, construcción 7 (trímero dividido de FAP con doble anti-FAP en el extremo N de la cadena de ojal Fc y residuos cargados en CH1 y CL cruzados fusionado con ligandos 4-1BB).

Tabla 8: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB humano dirigido a FAP, construcción 1.7

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
129	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
130	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
144	cadena de ojal Fc [anti-FAP (28H1)]$_2$	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCA GCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGG CTTCACCTTCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACA GGCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTG GGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGG GCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCC TGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTC GACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAG CGCTAGCACAAAGGGACCTAGCGTGTTCCCCCTGGCCCC CAGCAGCAAGTCTACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGG GCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCCGTGACCG TGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACA CCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTC TGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCT GCGACGGCGGAGGGGGATCTGGCGGCGGAGGATCCGAA GTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCC TGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTT CACCTTCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGC TCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGC CTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCC GGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCCTGT

		ACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGAC TACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGCGCT AGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGC AGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTC CTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTT CAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGAC AAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGC TGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT GCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
69	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2
115	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
116	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
145	cadena de ojal Fc [anti-FAP (28H1)]$_2$	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQA PGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWV SAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
19	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2

La tabla 9 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un

trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP bivalente, construcción 1.8 (trímero dividido de FAP con ligandos 4-1BB fusionado con CrossFab anti-FAP, con residuos cargados, en la cadena de botón).

Tabla 9: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB humano dirigido a FAP, construcción 1.8

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
146	4-1BBL hu dimérico (71-254) - FAP (VHCL*) cadena de botón Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCA GCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCA GCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCT GAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCC TGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAA CTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTT CAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTC AGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCG CTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGA CCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCT TCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGAC AGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCC CGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTG GGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTG CCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGTTCCGGAGG CGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAG GCCTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCG CCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCCACGCCATGTCCTG GGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGT CCGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACT CTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCA

		AGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCT GGGCAACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCA CCGTGTCCAGCGCTAGCGTGGCTGCACCATCTGTCTTTA TCTTCCCACCCAGCGACCGGAAGCTGAAGTCTGGCACA GCCAGCGTCGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCCGC GAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCA GAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGAC CCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACG CCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGC CCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACC CTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAAT TGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGAC CAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG TGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTAAA
147	4-1BBL hu monomérico (71-254)-FAP (VLCH1*)	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCCGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCCAGGCACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGCCTGCCTAGC CCTAGATCTGAAGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGG ATCTGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGAG CCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCAGAG CCAGCCAGAGCGTGAGCCGGAGCTACCTGGCCTGGTAT CAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCAGACTGCTGATCAT CGGCGCCAGCACCCGGGCCACCGGCATCCCCGATAGAT TCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCA TCAGCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACT GCCAGCAGGGCCAGGTGATCCCCCCCACCTTCGGCCAG GGCACCAAGGTGGAAATCAAGTCCTCTGCTAGCACAAA

		GGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAG CACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGG AAGATTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATT CTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCG TGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCG TGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACA TCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACGAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGC
68	cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1)	véase la tabla 2
69	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2
148	4-1BBL hu dimérico (71-254)-FAP (VHCL*) cadena de botón Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPEL SPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNS AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSEVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAI WASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPS DRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
149	4-1BBL hu monomérico (71-254)-FAP (VLCH1*)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSEIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQAPRL LIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QGQVIPPTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
18	cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1)	véase la tabla 2
19	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2

La tabla 10 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (52-254) dirigido a FAP monovalente, construcción 1.9 (trímero dividido de FAP con aminoácidos 52-254 de ectodominio 4-1BBL y residuos cargados en cadenas de ligandos).

Tabla 10: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB humano dirigido a FAP, construcción 1.9

150	4-1BBL hu dimérico (52-254) - CH1* cadena de botón Fc	CCTTGGGCTGTGTCTGGCGCTAGAGCCTCTCCTGGATCT GCCGCCAGCCCCAGACTGAGAGAGGGACCTGAGCTGAG CCCCGATGATCCTGCCGGACTGCTGGATCTGAGACAGG GCATGTTCGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGA TCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGG CTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAG GACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTA CTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGC CGGCGAGGGATCTGGATCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCT GCAGCCCCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCC GGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGACTGCTGCACC TGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACA GAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGG CGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGAT TCCAGCCGGACTGCCCAGCCCTAGATCTGAAGGCGGCG GAGGAAGCGGAGGCGGAGGATCCCCTTGGGCTGTGTCT GGCGCTAGAGCCTCTCCTGGATCTGCCGCCAGCCCCAGA CTGAGAGAGGGACCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGC CGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTCGCTCAGCT GGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGTC CTGGTACTCCGACCCTGGCCTGGCAGGGGTGTCCCTGAC TGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGG TGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGC TGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGA TCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCTCTGCGCTCTG CTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGC CACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGG TTCCAAGGACGGCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCG CCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGC ATGCTTGGCAGCTGACCCAGGGGGCAACTGTGCTGGGA CTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCCGCTGGCCTGCCT AGCCCAAGAAGTGAAGGGGGAGGCGGATCTGGCGGAG GGGGATCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCC TGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCC GCTCTGGGCTGCCTGGTCGAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGG CGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCT GTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAG CCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACA

		AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAGCCC AAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC AGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
151	4-1BBL hu monomérico (52-254) - CL*	CCTTGGGCTGTGTCTGGCGCTAGAGCCTCTCCTGGATCT GCCGCCAGCCCCAGACTGAGAGAGGGACCTGAGCTGAG CCCCGATGATCCTGCCGGACTGCTGGATCTGAGACAGG GCATGTTCGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGA TCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGG CTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAG GACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTA CTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGC CGGCGAGGGATCTGGATCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCT GCAGCCCCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCC GGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACC TGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACA GAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGG CGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGAT TCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAG GCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCA CCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATCGGAAGTTGA AATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAC AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
68	cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1)	véase la tabla 2
69	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2
111	4-1BBL hu dimérico (52-254) - CH1* cadena de botón Fc	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGM FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR

		SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSP RSEGGGGSGGGGSPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSP DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAG VSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLG LFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD EKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
112	4-1BBL hu monomérico (52-254) - CL*	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGM FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSP RSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1)	véase la tabla 2
19	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2

La tabla 11 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (80-254) dirigido a FAP monovalente, construcción 1.10 (trímero dividido de FAP con aminoácidos 80-254 de ectodominio 4-1BBL y residuos cargados en cadenas de ligandos).

Tabla 11: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB humano dirigido a FAP, construcción 10

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
152	4-1BBL hu dimérico (80-254) - CH1* cadena de botón Fc	GATCCTGCCGGCCTGCTGGATCTGCGGCAGGGAATGTTT GCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGG CCCCCTGAGCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGT GTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCA AAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTG TTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAA GGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCC CTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGAC

		AGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAG CGCATTTGGGTTTCAAGGCAGACTGCTGCACCTGTCTGC CGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCA GGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACA GTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCC GGACTGCCCAGCCCTAGATCTGAAGGCGGCGGAGGAAG CGGAGGCGGAGGATCCGACCCAGCTGGACTGCTGGACC TGCGGCAGGGAATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATG TGCTGCTGATTGACGGACCTCTGTCCTGGTACTCCGACC CTGGCCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCT ACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCT GGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGG GTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCT CTGCATCTGCAGCCTCTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCT GCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGC GAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGGCT GCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATC TGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTG ACCCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACA CCTGAGATCCCCGCTGGCCTGCCTAGCCCAAGAAGTGA AGGGGGAGGCGGATCTGGCGGAGGGGGATCTGCTAGCA CCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCA AGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTG GTCGAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCC GCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGC GTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACGAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAG GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC AGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
153	4-1BBL hu monomérico (80-254) - CL*	GATCCTGCCGGCCTGCTGGATCTGCGGCAGGGAATGTTT GCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGG CCCCCTGAGCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGT GTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCA AAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTG TTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAA GGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCC

		CTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGAC AGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAG CGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGC CGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCA GGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACA GTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCC GGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATC TGGCGGCGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCCGCCATCTGATCGGAAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
68	cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1)	véase la tabla 2
69	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2
113	4-1BBL hu dimérico (80-254) - CH1* cadena de botón Fc	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE GGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
114	4-1BBL hu monomérico (80-254) - CL*	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDR KLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
18	cadena de ojal Fc anti-FAP (28H1)	véase la tabla 2
19	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2

1.2 Producción de construcciones de fusión Fc de ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido a FAP (28H1)

Las secuencias que codifican la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando de TNF dirigidos se clonaron en un vector plásmido, que dirige la expresión del inserto a partir de un promotor MPSV y contiene una secuencia poliA sintética localizada en el extremo 3' del CDS. Además, el vector contiene una secuencia de EBV OriP para el mantenimiento episomal del plásmido.

La molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando de TNF dirigidos se produjo cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamíferos usando polietilenimina. Las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes en una proporción de 1:1:1:1 (por ejemplo, "vector ligando dimérico-(CH1 o CL)-cadena de botón": "vector fusión de ligando monomérico-(CL o CH1)": "vector Fab anti-FAP-cadena pesada de ojal": "vector cadena ligera anti-FAP") para las construcciones 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10. Para la construcción 5 bivalente, se usó una proporción de 1:1:1 ("vector cadena pesada de ojal": "vector cadena pesada de botón": "vector cadena ligera anti-FAP").

Para la producción en matraces de agitación de 500 mL, se sembraron 300 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, se centrifugaron las células durante 10 minutos a 210 x g y se reemplazó el sobrenadante por 20 mL de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión (200 µg de ADN total) se mezclaron en 20 mL de medio CD CHO. Después de la adición de 540 µL de PEI, la solución se agitó en vórtex durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, se mezclaron las células con la solución ADN/PEI, se transfirieron a un matraz de agitación de 500 mL y se incubó durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 160 mL de medio Excell suplementado con L-glutamina 6 mM, 5 g/L de PEPSOY y ácido valproico 1,2 mM y se cultivaron las células durante 24 horas. Un día después de la transfección se añadieron un 12 % de Feed 7 y glucosa (concentración final 3 g/L). Después de cultivarse durante 7 días, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación durante 30-40 minutos a 400 x g. La solución se filtró en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm), se suplementó con acida sódica hasta una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantuvo en 4 °C.

La molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando de TNF dirigido se purificó a partir de los sobrenadantes del cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, se cargó el sobrenadante en una columna MabSelect Sure (CV = 5-15 mL, resina de GE Healthcare) equilibrado con fosfato de sodio 20 mM, tampón de citrato de sodio 20 mM (pH 7,5). La proteína no unida se eliminó lavando con al menos 6 volúmenes de columna del mismo tampón. La proteína unida se eluyó usando un gradiente lineal (20 CV) o una elución escalonada (8 CV) con citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, tampón de glicina 100 mM (pH 3,0). Para el gradiente lineal, se aplicó una elución escalonada adicional de 4 volúmenes de columna.

El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/10 (v/v) de fosfato de sodio 0.5 M, pH 8,0. La proteína se concentró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, solución Tween20 al 0,01 % (v/v) de pH 6,0.

Se determinó la concentración de proteína midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando un coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos. La pureza y el peso molecular de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando de TNF dirigidos se analizaron mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con Coomassie SimpleBlue™ SafeStain (Invitrogen USA) o CE-SDS usando Caliper LabChip GXII (Perkin Elmer). Se analizó el contenido de agregado de las muestras usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7 a 25 °C.

La tabla 12 resume el rendimiento y el contenido final de monómero de las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen trímeros de 4-1BBL dirigido a FAP.

Tabla 12: Análisis bioquímico de las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen trímeros de 4-1BBL dirigido a FAP (28H1)

Construcción	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%] (SEC)
Construcción 1.1	12,7	95
Construcción 1.2	25,2	97
Construcción 1.3	22	92
Construcción 1.4	14,2	99
Construcción 1.5	14	99
Construcción 1.6	12	98
Construcción 1.7	3,4	99
Construcción 1.8	5,4	98
Construcción 1.9	11,2	98
Construcción 1.10	19,8	99

1.3 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB murino dirigido

De forma similar a las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB humano dirigido, se prepararon moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímeros de 4-1BBL dirigido a FAP murino.

Se sintetizó la secuencia de ADN que codifica parte del ectodominio (aminoácidos 104-309) del ligando 4-1BB murino de acuerdo con la secuencia Q3U1Z9-1 de la base de datos Uniprot (SEQ ID NO: 70). Para la construcción M.1, las cisteínas en las posiciones 137, 160 y 246 se mutaron a Serina mediante procedimientos de PCR estándar, mientras que para la construcción M.2, la cisteína en la posición 160 se mutó a Serina (C160S).

El ligando murino se ensambló como se describe para el 4-1BBL humano y como se representa en la figura 3A y 3B. El 4-1BBL dimérico, separado por conectores ($G4S_2$), se fusionó con el dominio IgG1-CL murino (Figura 3A) y el 4-1BBL monomérico se fusionó con el dominio IgG1-CH murino (Figura 3B). El polipéptido que codifica el ligando 4-1BB dimérico fusionado con el dominio CL murino se subclonó sin cambio de pauta de lectura con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 murina para construir las construcciones como se representa en la figura 3C.

Para las construcciones murinas, se introdujeron las mutaciones Lys392Asp y Lys409Asp (DD) en la cadena pesada que contiene el 4-1BBL murino y las mutaciones Glu356Lys y Asp399Lys (KK) se introdujeron en la cadena pesada que contiene la Fab anti-FAP para obtener moléculas asimétricas (Gunasekaran K. et al., J Biol. Chem., 18 de junio de 2010; 285(25): 19637-46).

Las mutaciones Asp265Ala y Pro329Gly (DAPG) se introdujeron en la región constante de las cadenas pesadas para anular la unión a los receptores gamma Fc.

La tabla 13 muestra, respectivamente, las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la contrucción M.1 de la molécula de unión a antígeno de fusión Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB murino dirigido a FAP.

Tabla 13: Secuencias de la construcción M.1 murina dirigida a FAP

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
71	4-1BBL murino dimérico (104-309, C137,160,246S) - CL cadena DD Fc	AGAACCGAGCCCAGACCCGCCCTGACCATCACCACCAG CCCTAACCTGGGCACCAGAGAGAACAACGCCGACCAAG TGACCCCCGTGTCCCACATCGGCAGCCCCAATACCACAC AGCAGGGCAGCCCTGTGTTCGCCAAGCTGCTGGCCAAG AACCAGGCCAGCCTGAGCAACACCACCCTGAACTGGCA CAGCCAGGATGGCGCCGGAAGCAGCTATCTGAGCCAGG GCCTGAGATACGAAGAGGACAAGAAAGAACTGGTGGTG GACAGCCCTGGCCTGTACTACGTGTTCCTGGAACTGAAG

		CTGAGCCCCACCTTCACCAACACCGGCCACAAGGTGCA GGGCTGGGTGTCACTGGTGCTGCAGGCCAAACCCCAGG TGGACGACTTCGACAACCTGGCCCTGACCGTGGAACTGT TCCCCAGCAGCATGGAAAACAAGCTGGTGGATCGGAGC TGGTCCCAGCTTCTGCTGCTGAAGGCCGGACACAGACTG AGCGTGGGCCTGAGGGCTTATCTGCACGGCGCCCAGGA CGCCTACAGAGACTGGGAGCTGAGCTACCCCAACACAA CCAGCTTCGGCCTGTTCCTCGTGAAGCCCGACAACCCTT GGGAAGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGATCTAGA ACAGAGCCTCGGCCTGCCCTGACAATTACCACATCCCCC AATCTGGGCACCCGGGAAAACAATGCAGATCAAGTGAC ACCTGTGTCTCATATTGGCTCCCCAAACACTACCCAGCA GGGCTCCCCCGTGTTTGCTAAACTGCTGGCTAAAAATCA GGCCTCCCTGTCTAACACAACACTGAACTGGCACTCCCA GGACGGCGCTGGCAGCTCTTACCTGAGTCAGGGACTGC GCTATGAGGAAGATAAGAAAGAACTGGTGGTGGATTCC CCCGGACTGTACTATGTGTTTCTGGAACTGAAACTGTCC CCTACCTTTACAAATACCGGGCACAAAGTGCAGGGATG GGTGTCCCTGGTGCTGCAGGCTAAGCCTCAGGTGGACGA TTTTGATAATCTGGCTCTGACAGTGGAACTGTTTCCTAG CAGCATGGAAAACAAGCTGGTGGACAGAAGCTGGTCCC AGCTCCTGCTGCTGAAGGCCGGACACAGACTGAGCGTG GGCCTGAGAGCCTATCTGCACGGCGCCCAGGACGCCTA CAGAGACTGGGAGCTGAGCTACCCCAACACAACCAGCT TCGGCCTGTTCCTCGTGAAGCCCGACAACCCTTGGGAAG GCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGATCCAGAGCTGAT GCTGCCCCTACCGTGTCCATCTTCCCACCCAGCAGCGAG CAGCTGACATCTGGGGGAGCTAGCGTCGTGTGCTTCCTG AACAACTTCTACCCCAAGGACATCAACGTGAAGTGGAA GATCGACGGCAGCGAGCGGCAGAACGGCGTGCTGAATA GCTGGACCGACCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGC ATGAGCAGCACCCTGACCCTGACCAAGGACGAGTACGA GCGGCACAACAGCTACACATGCGAGGCCACCCACAAGA CCAGCACCAGCCCCATCGTGAAGTCCTTCAACCGGAAC GAGTGCGTGCCCAGAGACTGCGGCTGCAAGCCTTGCAT CTGCACCGTGCCTGAGGTGTCCAGCGTGTTCATCTTCCC ACCCAAGCCCAAGGACGTGCTGACCATCACCCTGACAC CCAAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCATCAGCAAGGAT GACCCCGAGGTGCAGTTCAGTTGGTTCGTGGACGACGTG GAAGTGCACACCGCTCAGACCAAGCCCAGAGAGGAACA GATCAACAGCACCTTCAGAAGCGTGTCCGAGCTGCCCAT CATGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATTCAAGT GCAGAGTGAACAGCGCCGCCTTTGGCGCCCCTATCGAG AAAACCATCTCCAAGACCAAGGGCAGACCCAAGGCCCC CCAGGTGTACACAATCCCCCCACCCAAAGAACAGATGG CCAAGGACAAGGTGTCCCTGACCTGCATGATCACCAATT TCTTCCCAGAGGATATCACCGTGGAATGGCAGTGGAAC GGCCAGCCCGCCGAGAACTACGACAACACCCAGCCTAT CATGGACACCGACGGCTCCTACTTCGTGTACAGCGACCT GAACGTGCAGAAGTCCAACTGGGAGGCCGGCAACACCT TCACCTGTAGCGTGCTGCACGAGGGCCTGCACAACCACC ACACCGAGAAGTCCCTGTCCCACAGCCCTGGCAAG
72	4-1BBL murino monomérico (104-309,	AGAACCGAGCCCAGACCCGCCCTGACCATCACCACCAG CCCTAACCTGGGCACCAGAGAGAACAACGCCGACCAAG

	C137,160,246S) - CL	TGACCCCCGTGTCCCACATCGGCAGCCCCAATACCACAC AGCAGGGCAGCCCTGTGTTCGCCAAGCTGCTGGCCAAG AACCAGGCCAGCCTGAGCAACACCACCCTGAACTGGCA CAGCCAGGATGGCGCCGGAAGCAGCTATCTGAGCCAGG GCCTGAGATACGAAGAGGACAAGAAAGAACTGGTGGTG GACAGCCCTGGCCTGTACTACGTGTTCCTGGAACTGAAG CTGAGCCCCACCTTCACCAACACCGGCCACAAGGTGCA GGGCTGGGTGTCACTGGTGCTGCAGGCCAAACCCCAGG TGGACGACTTCGACAACCTGGCCCTGACCGTGGAACTGT TCCCCAGCAGCATGGAAAACAAGCTGGTGGATCGGAGC TGGTCCCAGCTTCTGCTGCTGAAGGCCGGACACAGACTG AGCGTGGGCCTGAGGGCCTATCTGCATGGCGCCCAGGA CGCCTACAGAGACTGGGAGCTGAGCTACCCCAACACAA CCAGCTTCGGCCTGTTCCTCGTGAAGCCCGACAACCCTT GGGAAGGCGGCGGAGGCTCCGGAGGAGGCGGAAGCGC TAAGACCACCCCCCCCAGCGTGTACCCTCTGGCCCCTGG ATCTGCCGCCCAGACCAACAGCATGGTGACCCTGGGCT GCCTGGTGAAGGGCTACTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGA CCTGGAACAGCGGCAGCCTGAGCAGCGGCGTGCACACC TTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACACCCTGAGC AGCTCCGTGACCGTGCCTAGCAGCACCTGGCCCAGCCA GACAGTGACCTGCAACGTGGCCCACCCTGCCAGCAGCA CCAAGGTGGACAAGAAAATCGTGCCCCGGGACTGC
73	cadena pesada KK Fc anti-FAP (28H1)	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCA GCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGG CTTCACCTTCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACA GGCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTG GGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGG GCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCC TGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTC GACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAG CGCTAAGACCACCCCCCCTAGCGTGTACCCTCTGGCCCC TGGATCTGCCGCCCAGACCAACAGCATGGTGACCCTGG GCTGCCTGGTGAAGGGCTACTTCCCCGAGCCTGTGACCG TGACCTGGAACAGCGGCAGCCTGAGCAGCGGCGTGCAC ACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACACCCTG AGCAGCTCCGTGACCGTGCCTAGCAGCACCTGGCCCAG CCAGACAGTGACCTGCAACGTGGCCCACCCTGCCAGCA GCACCAAGGTGGACAAGAAAATCGTGCCCCGGGACTGC GGCTGCAAGCCCTGCATCTGCACCGTGCCCGAGGTGTCC AGCGTGTTCATCTTCCCACCCAAGCCCAAGGACGTGCTG ACCATCACCCTGACCCCCAAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GCCATCAGCAAGGACGACCCCGAGGTGCAGTTCTCTTG GTTTGTGGACGACGTGGAGGTGCACACAGCCCAGACAA AGCCCCGGGAGGAACAGATCAACAGCACCTTCAGAAGC GTGTCCGAGCTGCCCATCATGCACCAGGACTGGCTGAAC GGCAAAGAATTCAAGTGCAGAGTGAACAGCGCCGCCTT CGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGG GCAGACCCAAGGCCCCCCAGGTGTACACCATCCCCCCA CCCAAAAAACAGATGGCCAAGGACAAGGTGTCCCTGAC CTGCATGATCACCAACTTTTTCCCCGAGGACATCACCGT GGAGTGGCAGTGGAATGGCCAGCCCGCCGAGAACTACA AGAACACCCAGCCCATCATGAAGACCGACGGCAGCTAC

		TTCGTGTACAGCAAGCTGAACGTGCAGAAGTCCAACTG GGAGGCCGGCAACACCTTCACCTGTAGCGTGCTGCACG AGGGCCTGCACAACCACCACACCGAGAAGTCCCTGAGC CACTCCCCCGGCAAG
74	cadena ligera anti-FAP(28H1)	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGGCACCCTGTCTCTG AGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTC CCAGTCCGTGTCCCGGTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCA GAAGCCCGGCCAGGCCCCTCGGCTGCTGATCATCGGCG CCTCTACCAGAGCCACCGGCATCCCTGACCGGTTCTCCG GCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCC GGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGC AGGGCCAGGTCATCCCTCCCACCTTTGGCCAGGGCACCA AGGTGGAAATCAAGCGTGCCGATGCTGCACCAACTGTA TCGATTTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGA GGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCC AAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGA ACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGG ACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTC ACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTA TACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCAT TGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT
75	4-1BBL murino dimérico (104-309, C137,160,246S) - CL cadena DD Fc	RTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGSPNTTQQGS PVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHSQDGAGSSYLSQGLRYEE DKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPTFTNTGHKVQGWVSLVL QAKPQVDDFDNLALTVELFPSSMENKLVDRSWSQLLLLKA GHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNTTSFGLFLVKP DNPWEGGGGSGGGGSRTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQ VTPVSHIGSPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHS QDGAGSSYLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSP TFTNTGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFPSS MENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQDAYR DWELSYPNTTSFGLFLVKPDNPWEGGGGSGGGGSRADAA PTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNRNECVPRDCGCKPCICTVPEVSSVF IFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDV EVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCR VNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKV SLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGS YFVYSDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLS HSPGK
76	4-1BBL murino monomérico (104-309, C137,160,246S) - CL	RTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGSPNTTQQGS PVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHSQDGAGSSYLSQGLRYEE DKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPTFTNTGHKVQGWVSLVL QAKPQVDDFDNLALTVELFPSSMENKLVDRSWSQLLLLKA GHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNTTSFGLFLVKP DNPWEGGGGSGGGGSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVT LGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC

77	cadena KK Fc anti-FAP (28H1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQA PGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSAK TTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWN SGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCN VAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPK DVLTITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQ TKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFG APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCMIT NFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKL NVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
78	cadena ligera anti-FAP(28H1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKP GQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWT DQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI VKSFNRNEC

La tabla 14 muestra, respectivamente, las secuencias de ADNc y de aminoácidos del control M.1 de la molécula de unión a antígeno de fusión Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB murino (DP47) no dirigido.

Tabla 14: Secuencias de control M.1 murino no dirigido

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
71	4-1BBL murino dimérico (104-309, C137,160,246S) - CL cadena DD Fc	Véase la tabla 13
72	4-1BBL murino monomérico (104-309, C137,160,246S) - CH1	Véase la tabla 13
154	cadena KK FC de DP47	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGG ATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTA GTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG CTAAGACCACCCCCCCTAGCGTGTACCCTCTGGCCCCTG GATCTGCCGCCCAGACCAACAGCATGGTGACCCTGGGC TGCCTGGTGAAGGGCTACTTCCCCGAGCCTGTGACCGTG ACCTGGAACAGCGGCAGCCTGAGCAGCGGCGTGCACAC CTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACACCCTGAG CAGCTCCGTGACCGTGCCTAGCAGCACCTGGCCCAGCCA GACAGTGACCTGCAACGTGGCCCACCCTGCCAGCAGCA

		CCAAGGTGGACAAGAAAATCGTGCCCCGGGACTGCGGC TGCAAGCCCTGCATCTGCACCGTGCCCGAGGTGTCCAGC GTGTTCATCTTCCCACCCAAGCCCAAGGACGTGCTGACC ATCACCCTGACCCCCAAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCC ATCAGCAAGGACGACCCCGAGGTGCAGTTCTCTTGGTTT GTGGACGACGTGGAGGTGCACACAGCCCAGACAAAGCC CCGGGAGGAACAGATCAACAGCACCTTCAGAAGCGTGT CCGAGCTGCCCATCATGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAAGAATTCAAGTGCAGAGTGAACAGCGCCGCCTTCGG CGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGGCA GACCCAAGGCCCCCCAGGTGTACACCATCCCCCCACCCA AAAAACAGATGGCCAAGGACAAGGTGTCCCTGACCTGC ATGATCACCAACTTTTTCCCCGAGGACATCACCGTGGAG TGGCAGTGGAATGGCCAGCCCGCCGAGAACTACAAGAA CACCCAGCCCATCATGAAGACCGACGGCAGCTACTTCGT GTACAGCAAGCTGAACGTGCAGAAGTCCAACTGGGAGG CCGGCAACACCTTCACCTGTAGCGTGCTGCACGAGGGCC TGCACAACCACCACACCGAGAAGTCCCTGAGCCACTCC CCCGGCAAG
155	cadena ligera DP47	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGG CAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG ACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA GTATGGTAGCTCACCGCTGACGTTCGGCCAGGGGACCA AAGTGGAAATCAAACGTGCCGATGCTGCACCAACTGTA TCGATTTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGA GGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCC AAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGA ACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGG ACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTC ACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTA TACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCAT TGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT
75	4-1BBL murino dimérico (104-309, C137,160,246S) - CL cadena DD Fc	véase la tabla 13
76	4-1BBL murino monomérico (104-309, C137,160,246S) - CH1	Véase la tabla 13
156	cadena KK FC de DP47	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSAKTTP PSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAH

		PASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKP REEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPI EKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCMITNFF PEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKLNV QKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
157	cadena ligera DP47	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGSSPLTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWT DQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI VKSFNRNEC

La tabla 15 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la contrucción M.2 de la molécula de unión a antígeno de fusión Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB murino dirigido a FAP.

Tabla 15: Secuencias de la construcción M.2 murina dirigida a FAP

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
158	4-1BBL murino dimérico (104-309, C160S) - CL cadena DD Fc	AGAACCGAGCCCAGACCCGCCCTGACCATCACCACCAG CCCTAACCTGGGCACCAGAGAGAACAACGCCGACCAAG TGACCCCCGTGTCCCACATCGGCTGCCCCAATACCACAC AGCAGGGCAGCCCTGTGTTCGCCAAGCTGCTGGCCAAG AACCAGGCCAGCCTGAGCAACACCACCCTGAACTGGCA CAGCCAGGATGGCGCCGGAAGCAGCTATCTGAGCCAGG GCCTGAGATACGAAGAGGACAAGAAAGAACTGGTGGTG GACAGCCCTGGCCTGTACTACGTGTTCCTGGAACTGAAG CTGAGCCCCACCTTCACCAACACCGGCCACAAGGTGCA GGGCTGGGTGTCACTGGTGCTGCAGGCCAAACCCCAGG TGGACGACTTCGACAACCTGGCCCTGACCGTGGAACTGT TCCCCTGCAGCATGGAAAACAAGCTGGTGGATCGGAGC TGGTCCCAGCTTCTGCTGCTGAAGGCCGGACACAGACTG AGCGTGGGCCTGAGGGCTTATCTGCACGGCGCCCAGGA CGCCTACAGAGACTGGGAGCTGAGCTACCCCAACACAA CCAGCTTCGGCCTGTTCCTCGTGAAGCCCGACAACCCTT GGGAAGGCGGCGGAGGCTCCGGAGGAGGCGGATCTAGA ACAGAGCCTCGGCCTGCCCTGACAATTACCACATCCCCC AATCTGGGCACCCGGGAAAACAATGCAGATCAAGTGAC ACCTGTGTCTCATATTGGGTGCCCCAACACTACCCAGCA GGGGTCCCCAGTGTTTGCTAAACTGCTGGCTAAAAATCA GGCCTCCCTGTCTAACACAACACTGAATTGGCATAGTCA GGACGGGGCTGGCAGCAGCTACCTGTCTCAGGGACTGC GCTATGAGGAAGATAAGAAAGAACTGGTGGTGGATTCC CCCGGACTGTACTATGTGTTTCTGGAACTGAAACTGTCC CCTACCTTTACAAATACCGGGCACAAAGTGCAGGGATG GGTGTCCCTGGTGCTGCAGGCTAAGCCTCAGGTGGACGA TTTTGATAATCTGGCTCTGACAGTGGAACTGTTTCCTTGC TCTATGGAAAACAAACTGGTGGACCGCTCTTGGAGCCA GTTGCTGCTGCTGAAAGCTGGCCACCGGCTGTCTGTGGG

		ACTGAGAGCATACCTGCATGGGGCACAGGATGCCTACC GGGATTGGGAACTGTCCTACCCTAACACTACTTCCTTCG GACTGTTCCTCGTGAAACCTGATAATCCCTGGGAGGGCG GAGGCGGAAGTGGCGGAGGGGGATCCAGAGCTGATGCT GCCCCTACCGTGTCCATCTTCCCACCCAGCAGCGAGCAG CTGACATCTGGGGGAGCTAGCGTCGTGTGCTTCCTGAAC AACTTCTACCCCAAGGACATCAACGTGAAGTGGAAGAT CGACGGCAGCGAGCGGCAGAACGGCGTGCTGAATAGCT GGACCGACCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCATG AGCAGCACCCTGACCCTGACCAAGGACGAGTACGAGCG GCACAACAGCTACACATGCGAGGCCACCCACAAGACCA GCACCAGCCCCATCGTGAAGTCCTTCAACCGGAACGAG TGCGTGCCCAGAGACTGCGGCTGCAAGCCTTGCATCTGC ACCGTGCCTGAGGTGTCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCC AAGCCCAAGGACGTGCTGACCATCACCCTGACACCCAA AGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCATCAGCAAGGATGACC CCGAGGTGCAGTTCAGTTGGTTCGTGGACGACGTGGAA GTGCACACCGCTCAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGAT CAACAGCACCTTCAGAAGCGTGTCCGAGCTGCCCATCAT GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATTCAAGTGCA GAGTGAACAGCGCCGCCTTTGGCGCCCCTATCGAGAAA ACCATCTCCAAGACCAAGGGCAGACCCAAGGCCCCCCA GGTGTACACAATCCCCCCACCCAAAGAACAGATGGCCA AGGACAAGGTGTCCCTGACCTGCATGATCACCAATTTCT TCCCAGAGGATATCACCGTGGAATGGCAGTGGAACGGC CAGCCCGCCGAGAACTACGACAACACCCAGCCTATCAT GGACACCGACGGCTCCTACTTCGTGTACAGCGACCTGAA CGTGCAGAAGTCCAACTGGGAGGCCGGCAACACCTTCA CCTGTAGCGTGCTGCACGAGGGCCTGCACAACCACCAC ACCGAGAAGTCCCTGTCCCACAGCCCTGGCAAG
159	4-1BBL murino monomérico (104-309, C160S) - CH1	AGAACCGAGCCCAGACCCGCCCTGACCATCACCACCAG CCCTAACCTGGGCACCAGAGAGAACAACGCCGACCAAG TGACCCCCGTGTCCCACATCGGCTGCCCCAATACCACAC AGCAGGGCAGCCCTGTGTTCGCCAAGCTGCTGGCCAAG AACCAGGCCAGCCTGAGCAACACCACCCTGAACTGGCA CAGCCAGGATGGCGCCGGAAGCAGCTATCTGAGCCAGG GCCTGAGATACGAAGAGGACAAGAAAGAACTGGTGGTG GACAGCCCTGGCCTGTACTACGTGTTCCTGGAACTGAAG CTGAGCCCCACCTTCACCAACACCGGCCACAAGGTGCA GGGCTGGGTGTCACTGGTGCTGCAGGCCAAACCCCAGG TGGACGACTTCGACAACCTGGCCCTGACCGTGGAACTGT TCCCCTGCAGCATGGAAAACAAGCTGGTGGATCGGAGC TGGTCCCAGCTTCTGCTGCTGAAGGCCGGACACAGACTG AGCGTGGGCCTGAGGGCTTATCTGCACGGCGCCCAGGA CGCCTACAGAGACTGGGAGCTGAGCTACCCCAACACAA CCAGCTTCGGCCTGTTCCTCGTGAAGCCCGACAACCCTT GGGAAGGCGGCGGAGGCTCCGGAGGAGGCGGAAGCGC TAAGACCACCCCCCCCAGCGTGTACCCTCTGGCCCCTGG ATCTGCCGCCCAGACCAACAGCATGGTGACCCTGGGCT GCCTGGTGAAGGGCTACTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGA CCTGGAACAGCGGCAGCCTGAGCAGCGGCGTGCACACC TTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACACCCTGAGC AGCTCCGTGACCGTGCCTAGCAGCACCTGGCCCAGCCA GACAGTGACCTGCAACGTGGCCCACCCTGCCAGCAGCA CCAAGGTGGACAAGAAAATCGTGCCCCGGGACTGC

73	cadena KK Fc anti-FAP (28H1)	véase la tabla 13
74	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 13
160	4-1BBL murino dimérico (104-309, C160S) - CL cadena DD Fc	RTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGCPNTTQQGS PVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHSQDGAGSSYLSQGLRYEE DKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPTFTNTGHKVQGWVSLVL QAKPQVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLLK AGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNTTSFGLFLVK PDNPWEGGGGSGGGGSRTEPRPALTITTSPNLGTRENNAD QVTPVSHIGCPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLSNTTLNWH SQDGAGSSYLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLS PTFTNTGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFPCS MENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQDAYR DWELSYPNTTSFGLFLVKPDNPWEGGGGSGGGGSRADAA PTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNRNECVPRDCGCKPCICTVPEVSSVF IFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDV EVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCR VNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKV SLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGS YFVYSDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLS HSPGK
161	4-1BBL murino monomérico (104-309, C160S) - CH1	RTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGCPNTTQQGS PVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHSQDGAGSSYLSQGLRYEE DKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPTFTNTGHKVQGWVSLVL QAKPQVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLLK AGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNTTSFGLFLVK PDNPWEGGGGSGGGGSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMV TLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT LSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC
77	cadena KK Fc anti-FAP (28H1)	véase la tabla 13
78	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 13

La tabla 16 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos del control de contrucción M.2 de la molécula de unión a antígeno de fusión Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB murino no dirigido a DP47.

Tabla 16: Secuencias de control M.2 murino dirigido a FAP

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
158	4-1BBL mu dimérico (104-309, C160S) - CL cadena DD Fc	véase la tabla 15
159	4-1BBL mu monomérico (104-309, C160S) - CH1	véase la tabla 15
154	cadena KK FC de DP47	véase la tabla 14
155	cadena ligera DP47	véase la tabla 14
160	4-1BBL mu dimérico (104-309, C160S) - CL cadena DD Fc	véase la tabla 15

161	4-1BBL mu monomérico (104-309, C160S) - CH1	véase la tabla 15
156	cadena KK FC de DP47	véase la tabla 14
157	cadena ligera DP47	véase la tabla 14

Las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB murino se produjeron y purificaron como se describe anteriormente en el presente documento para las construcciones de 4-1BBL humano.

La tabla 17 resume el rendimiento y el contenido final de monómero de la moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímeros de 4-1BBL murino dirigido y no dirigido a FAP.

Tabla 17: Resumen de la producción de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímeros de 4-1BBL murino dirigido y no dirigido a FAP

Construcción	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%] (SEC)
Construcción M.1	2,6	95
Control M.2	2,3	96
Construcción M.2	8,5	98
Control M.2	8,1	97

1.4 Preparación y purificación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB humano no dirigido (moléculas de control)

Las moléculas de control se prepararon como se describe anteriormente para las construcciones 1 y 2 dirigidas a FAP, con la única diferencia de que el aglutinante anti-FAP (VH-VL) se reemplazó por un control de línea germinal, denominado DP47, que no se unió al antígeno. El control es una (kih) de Fc ligando 4-1BB humano trimérico dividido monovalente no dirigido (control A, figura 5A) y para el control B, la construcción también contiene un entrecruzamiento de CH-CL con residuos cargados (figura 5B). La región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera del aglutinante de FAP se reemplazó por las del control de línea germinal (DP47) y se subclonó sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o la cadena ligera constante de IgG1 humana.

Las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB no dirigido se produjeron como se describe anteriormente para las construcciones dirigidas a FAP. Las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes en una proporción de 1:1:1:1 ("vector ligando dimérico-CH1 o CL*-cadena de botón": "vector fusión de ligando monomérico-CL o CH1*": "vector Fab de Dp47-cadena de ojal": "vector cadena ligera DP47").

La tabla 18 muestra, respectivamente, las secuencias de ADNc y de aminoácidos del control A de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB no dirigido a DP47.

Tabla 18: Secuencias de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB no dirigido a DP47 (trímero 4-1BBL dividido de DP47), control A

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
66	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CH1 cadena de botón Fc	Véase la tabla 2
67	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CL	véase la tabla 2

79	cadena de ojal Fc DP47	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGG ATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTA GTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGC TAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
80	cadena ligera DP47	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGG CAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG ACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA GTATGGTAGCTCACCGCTGACGTTCGGCCAGGGGACCA AAGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCT TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

14	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CH1 cadena de botón Fc	Véase la tabla 2
15	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CL	Véase la tabla 2
81	cadena de ojal Fc DP47	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
82	cadena ligera DP47	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGSSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC

La tabla 19 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB no dirigido a DP47 con el entrecruzamiento de CH1-CL y los residuos cargados en los brazos que contienen el ligando 4-1BB (control B).

Tabla 19: Secuencias de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB no dirigido a DP47 (trímero 4-1BBL dividido de DP47), control B

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
96	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
97	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
79	cadena de ojal Fc DP47	véase la tabla 18
80	cadena ligera DP47	véase la tabla 18
98	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
99	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
81	cadena de ojal Fc DP47	véase la tabla 18
82	cadena ligera DP47	véase la tabla 18

La **tabla 20** resume el rendimiento y el contenido de monómero final de las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB no dirigido a DP47.

Tabla 20: Características de producción de moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen trímeros de 4-1BBL no dirigidos a DP47 (moléculas de control)

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]	LC/MS (no rojo)
Control A	97	3,7	*Teórico*: 179069,7 Da Experimental: 179116,2 Da** sin lisinas terminales
Control B	99	15,4	

Ejemplo 2

2.1 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP (4B9)

Se sintetizaron diferentes fragmentos de la secuencia de ADN que codifica parte del ectodominio (aminoácidos 71-254 y 71-248) del ligando 4-1BB humano de acuerdo con la secuencia P41273 de la base de datos Uniprot (SEQ ID NO: 42).

2.1.1 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-254) dirigido a FAP (4B9) monovalente con dominios CH1-CL cruzados con residuos cargados (construcción 2.1)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-254), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el dominio de IgG1-CL humano, como se representa en la figura 1A: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CL humano.

Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-254) y fusionado con el dominio de IgG1-CH1 humano, como se representa en la figura 1B: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CH humano.

Se subclonó el polipéptido que codifica un ligando 4-1BB dimérico fusionado con el dominio **CL** humano sin cambio de pauta de lectura con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant, Zhu et al., 1998) usando un conector (G4S)2 o de forma alternativa(GSPGSSSSGS). .

Para mejorar el emparejamiento correcto, se han introducido las siguientes mutaciones en el CH-CL cruzado. En el ligando dimérico 4-1BB fusionado con CL humano se introdujeron las mutaciones E123R y Q124K. En el ligando monomérico 4-1BB fusionado con CH1 humano, las mutaciones K147E y K213E se clonaron en el dominio CH1 humano.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para la proteína de activación de fibroblastos (FAP), el clon 4B9, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o la cadena ligera constante de IgG1 humana.

La generación y preparación de los aglutinantes de FAP se describe en el documento WO 2012/020006 A2, que se incorpora en el presente documento como referencia.

Se han introducido 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 la publicación de patente internacional n.º WO 2012/130831.

Para todas las construcciones, se usó tecnología de heterodimerización de botones en ojal con las mutaciones S354C/T366W en la cadena de botón y las correspondientes mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V en la cadena de ojal.

La combinación de la cadena de botón de ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal anti-FAP-Fc dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-FAP permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y una Fab de unión a FAP (figura 4, construcción 2.1).

La tabla 21 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) humano de FAP (4B9) monovalente que contiene entrecruzamiento CH1-CL y residuos cargados (construcción 2.1).

Tabla 21: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene ligando de 4-1BB (71-254) humano dirigido a FAP(4B9) monovalente, construcción 2.1

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
129	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
130	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
162	cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9)	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCG GCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCC AGGCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATC ATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAA CACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGC GGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACAGT GTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCG CTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCG TGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTG TATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGC CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCA AGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA GCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

163	cadena ligera anti-FAP (4B9)	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGGCACCCTGTCTCTG AGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTC CCAGTCCGTGACCTCCTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCA GAAGCCCGGCCAGGCCCCTCGGCTGCTGATCAACGTGG GCAGTCGGAGAGCCACCGGCATCCCTGACCGGTTCTCCG GCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCC GGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGC AGGGCATCATGCTGCCCCCCACCTTTGGCCAGGGCACCA AGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCT TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
115	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
116	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
164	cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
125	cadena ligera anti-FAP (4B9)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKP GQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC

2.1.2 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-254) dirigido a FAP (4B9) monovalente con dominios CH1-CL cruzados sin residuos cargados (construcción 2.2)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-254), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el dominio de IgG1-CL humano, como se representa en la figura 1A: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CL humano.

Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-254) y fusionado con el dominio de IgG1-CH1 humano, como se representa en la figura 1B: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CH1 humano.

Se subclonó el polipéptido que codifica un ligando 4-1BB dimérico fusionado con el dominio **CL** humano sin cambio de pauta de lectura con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant, Zhu et al., 1998) usando un conector (G4S)2 o de forma alternativa(GSPGSSSSGS).

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para la proteína de activación de fibroblastos (FAP), el clon 4B9, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o la cadena ligera constante de IgG1 humana.

Se han introducido 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 (documento WO 2012/130831).

La combinación de la cadena de botón de ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal anti-FAP-Fc dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-FAP permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y una Fab de unión a FAP (figura 4, construcción 2.2).

La tabla 22 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) humano de FAP (4B9) monovalente que contiene entrecruzamiento CH1-CL sin residuos cargados (construcción 2.2).

Tabla 22: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene ligando 4-1BB (71-254) humano dirigido a FAP(4B9) monovalente, construcción 2.2

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
165	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL cadena de botón Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCA GCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCA GCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCT GAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCC TGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAA CTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTT CAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTC AGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCG CTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGA CCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCT TCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGAC AGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCC CGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTG GGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTG

		CCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGTTCCGGAGG GGGAGGATCTCGTACGGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTAT CTTTCCCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGC CTCCGTCGTGTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCTAGGGA AGCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAGT CCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCC AAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACACTG TCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCCACACCT GTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTT CTGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGA TGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGG TACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC GGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT GCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGG TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA
166	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCCGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCCAGGCACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGCCTGCCTAGC CCTAGATCTGAAGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGG ATCTGCTAGCACCAAAGGCCCTTCCGTGTTTCCTCTGGC TCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTGGAGGCACCGCTGCTCT CGGATGCCTCGTGAAGGATTATTTTCCTGAGCCTGTGAC AGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACCTCTGGAGTGC ATACTTTCCCCGCTGTGCTGCAGTCCTCTGGACTGTACA GCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGT CTTGT
162	cadena de ojal Fc	véase la tabla 21

	anti-FAP (4B9)	
163	cadena ligera anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21
117	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL cadena de botón Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPEL SPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNS AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
118	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC
164	cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21
125	cadena ligera anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21

2.1.3 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-254) dirigido a FAP (4B9) bivalente con los ligandos 4-1BB diméricos y monoméricos fusionados en el extremo C de cada cadena pesada (construcción 2.3)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-254), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el extremo C de la cadena de ojal Fc de IgG1 humana, como se representa en la figura 1C: ojal Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano. Un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-254) se fusionó con el extremo C de la cadena de botón Fc de IgG1 humana como se describe en la figura 1D: botón Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano.

El polipéptido que codifica el ligando dimérico 4-1BB se subclonó estructuralmente en el extremo C de los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el ojal (Merchant, Zhu et al. 1998) usando un conector (G4S)2. El polipéptido que codifica el ligando monomérico 4-1BB se subclonó estructuralmente en el extremo C de los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant, Zhu et al. 1998) usando un conector $(G4S)_2$.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para la proteína de activación de fibroblastos (FAP), el clon 4B9, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal, el botón o la cadena ligera constante de IgG1 humana.

Se han introducido 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.

La combinación de la cadena del ligando dimérico de ojal anti-FAP huIgG1 que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena del ligando monomérico de botón anti-FAP huIgG1 que contiene las mutaciones S354C/T366W y la cadena ligera anti-FAP permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fabs de unión a FAP (figura 4, construcción 2.3)

La tabla 23 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP (4B9) bivalente, construcción 2.3 (trímero dividido de FAP con 2 Fabs anti-FAP, ligando 4-1BB dimérico y monomérico fusionado en el extremo C de cada cadena pesada, respectivamente).

Tabla 23: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene ligando 4-1BB (71-254) humano dirigido a FAP(4B9) bivalente, construcción 2.3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
167	cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-254)	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCG GCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCC AGGCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATC ATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAA CACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGC GGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACAGT GTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCG CTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCG TGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTG TATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGC CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCA AGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA GCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT

		CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGG CGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCT GAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTG CGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTG CTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCT GGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTA CAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCG GCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAG TGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCC TGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAG CTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCG AGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTG CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGAC ACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCC CCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA GGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGG ACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGA TCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGA ATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCG ACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTG TCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAA AGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAG GCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCT GGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGC AGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTC TAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGAC GCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTG CATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCA GCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGT GACACCTGAGATCCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATC AGAA
168	cadena de botón Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-254)	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCG GCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCC AGGCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATC ATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAA CACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGC GGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACAGT GTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG TGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG CACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC

		CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGC TTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA CGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTG TGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAAC TGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTG TTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAG GCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCC TGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCT GCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGT GCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCC TGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTA CAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCG GCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAG TGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCC TGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAG CTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCG AGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTG CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGAC ACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCC CCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
163	cadena ligera anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21
123	cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEG GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

124	cadena de botón Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
125	cadena ligera anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21

2.1.4 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-248) dirigido a FAP (4B9) monovalente con dominios CH1-CL cruzados con residuos cargados (construcción 2.4)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-248), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el dominio de IgG1-CL humano, como se representa en la figura 1A: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CL humano. Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-248) y se fusionó con el dominio IgG1- CH humano, como se representa en la figura 1B: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CH humano.

Se subclonó el polipéptido que codifica un ligando 4-1BB dimérico fusionado con el dominio CL humano sin cambio de pauta de lectura con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant, Zhu et al., 1998) usando un conector (G4S)2 o de forma alternativa (GSPGSSSSGS). Para mejorar el emparejamiento correcto, se han introducido las siguientes mutaciones en el CH-CL cruzado. En el ligando dimérico 4-1BB fusionado con CL, E123R y Q124K humanos. En el ligando monomérico 4-1BB fusionado con CH1, K147E y K213E humanos.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para la proteína de activación de fibroblastos (FAP), el clon 4B9, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o la cadena ligera constante de IgG1 humana.

Se han introducido 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.

La combinación de la cadena de botón de ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal anti-FAP-Fc dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-FAP permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y una Fab de unión a FAP (**figura 4**, construcción 2.4).

La **tabla 24** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) humano de FAP (4B9) monovalente que contiene entrecruzamiento CH1-CL con residuos cargados (construcción 2.4).

Tabla 24: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene ligando 4-1BB (71-248) humano dirigido a FAP(4B9) monovalente, construcción 2.4

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
169	4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL* cadena de botón Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCT GCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGACTGGGAGG CGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCG AGCTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGA GACAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTG CTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCA GGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTAC AAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGG GGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGT GGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCT GCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAG CACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCG AGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTG CTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCT GCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGA CTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACAC CTGAGATCCCCGCTGGACTGGGCGGAGGCGGTTCCGGA GGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTT ATCTTCCCACCCAGCGACCGGAAGCTGAAGTCTGGCAC AGCCAGCGTCGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCCG CGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGC AGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGA CAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGA CCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTAC GCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTG ACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACAAGACCCA CACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGG CCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAG ACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG CCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC

		AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCTCCGGGTAAA
170	4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCT GCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGACTGGGAGG CGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTAGCACAAAGG GCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCA CATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGGAA GATTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCT GGCGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTG CTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTG ACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CGAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGC
162	cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21
163	cadena ligera anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21
119	4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL* cadena de botón Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTG GLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE

		VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
120	4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DEKVEPKSC
164	cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21
125	cadena ligera anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21

2.1.5 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-248) dirigido a FAP (4B9) monovalente con dominios CH1-CL cruzados sin residuos cargados (construcción 2.5)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-248), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el dominio de IgG1-CL humano, como se representa en la figura 1A: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CL humano. Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-248) y se fusionó con el dominio IgG1- CH humano, como se representa en la figura 1B: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CH humano.

Se subclonó el polipéptido que codifica un ligando 4-1BB dimérico fusionado con el dominio CL humano sin cambio de pauta de lectura con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant, Zhu et al., 1998) usando un conector (G4S)2 o de forma alternativa (GSPGSSSSGS).

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para la proteína de activación de fibroblastos (FAP), el clon 4B9, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o la cadena ligera constante de IgG1 humana.

Se han introducido 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.

La combinación de la cadena de botón de ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal anti-FAP-Fc dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-FAP permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y un Fab de unión a FAP (figura 4, construcción 2.5).

La tabla 25 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) humano de FAP (4B9) monovalente que contiene entrecruzamiento CH1-CL sin residuos cargados (construcción 2.5).

Tabla 25: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene ligando 4-1BB (71-248) humano dirigido a FAP(4B9) monovalente, construcción 2.5

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
171	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL cadena de botón Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCT GCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGACTGGGAGG CGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCG AGCTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGA GACAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTG CTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCA GGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTAC AAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGG GGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGT GGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCT GCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAG CACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCG AGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTG CTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCT GCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGA CTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACAC CTGAGATCCCCGCTGGACTGGGCGGAGGCGGTTCCGGA GGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTT ATCTTTCCCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACC GCCTCCGTCGTGTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCTAGG GAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCA GTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACT

		CCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACAC TGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCCACAC CTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCC TTCTGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCT GATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGG TGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATT GGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACC AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGT GGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA
172	4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCT GCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGACTGGGAGG CGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTAGCACCAAAG GCCCTTCCGTGTTTCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCAC CTCTGGAGGCACCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGA TTATTTTCCTGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAATAGCGG AGCACTGACCTCTGGAGTGCATACTTTCCCCGCTGTGCT GCAGTCCTCTGGACTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGAC AGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT
162	cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21
163	cadena ligera anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21

173	4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL cadena de botón Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTG GLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
174	4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSC
164	cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21
125	cadena ligera anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21

2.1.6 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-248) dirigido a FAP (4B9) bivalente con los ligandos 4-1BB diméricos y monoméricos fusionados en el extremo C de cada cadena pesada (construcción 2.6)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-248), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el extremo C de la cadena de ojal Fc de IgG1 humana, como se representa en la figura 1C: ojal Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano. Un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-248) se fusionó con el extremo C de la cadena de botón Fc de IgG1 humana como se describe en la figura 1D: botón Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano.

El polipéptido que codifica el ligando dimérico 4-1BB se subclonó estructuralmente en el extremo C de los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el ojal (Merchant, Zhu et al. 1998) usando un conector (G4S)2. El polipéptido que codifica el ligando monomérico 4-1BB se subclonó estructuralmente en el extremo C de los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant, Zhu et al. 1998) usando un conector (G4S)2.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para la proteína de activación de fibroblastos (FAP), el clon 4B9, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal, el botón o la cadena ligera constante de IgG1 humana.

Se han introducido 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.

La combinación de la cadena del ligando dimérico de ojal anti-FAP huIgG1 que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena del ligando monomérico de botón anti-FAP huIgG1 que contiene las

mutaciones S354C/T366W y la cadena ligera anti-FAP permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fab de unión a FAP (figura 4, construcción 2.6).

La tabla 26 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP (4B9) bivalente, construcción 2.6 (trímero dividido de FAP con 2 Fabs anti-FAP, ligando 4-1BB dimérico y monomérico fusionado en el extremo C de cada cadena pesada, respectivamente).

Tabla 26: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene ligando 4-1BB (71-248) humano dirigido a FAP(4B9) bivalente, construcción 2.6

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
175	Secuencia de nucleótidos de cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-248)	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCG GCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCC AGGCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATC ATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAA CACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGC GGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACAGT GTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCG CTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCG TGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTG

		TATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGC CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCA AGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA GCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGG CGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCT GAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTG CGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTG CTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCT GGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTA CAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCG GCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAG TGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCC TGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAG CTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCG AGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTG CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGAC ACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCC CCGAGATTCCAGCCGGCCTGGGCGGAGGCGGATCTGGC GGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGA CGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGT TCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACG GACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGG GTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATAC AAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATG TGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGG AGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGC CACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGA CTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAAC AGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGC GCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGC CAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAA CTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTG CCGGACTG
176	Secuencia de nucleótidos, cadena	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCG

	de botón Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-248)	GCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCC AGGCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATC ATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAA CACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGC GGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACAGT GTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG TGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG CACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGC TTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA CGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTG TGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAAC TGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTG TTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAG GCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCC TGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCT GCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGT GCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCC TGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTA CAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCG GCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAG TGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCC TGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAG CTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCG AGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTG CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGAC ACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCC CCGAGATTCCAGCCGGCCTG
163	cadena ligera anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21

126	cadena de ojal Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-248)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSG GGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
127	cadena de botón Fc anti-FAP (4B9) fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-248)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
125	cadena ligera anti-FAP (4B9)	véase la tabla 21

2.2 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB humano no dirigido (moléculas de control)

Se prepararon otras moléculas de control como se describe anteriormente en el ejemplo 1.4 para el control A y B. Se preparó una variante bivalente de control C en analogía con la construcción 2.3 y 2.6 bivalente y se preparó una variante monovalente de control E en analogía con la construcción 2.5 (que contiene un trímero de ligando 4-1BB (71-248), con la única diferencia que el aglutinante anti-FAP (VH-VL) se reemplazó por un control de la línea germinal, denominado DP47, que no se une al antígeno.

La tabla 27 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido no dirigido a DP47 bivalente; control C. La tabla 28 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente; control E.

Tabla 27: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene ligando 4-1BB (71-254) humano no dirigido a DP47 bivalente; control C

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
177	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-254)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGG ATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTA GTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGC TAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAG CAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGT CCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTG AGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCG ACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA GCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAA GCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGC CCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGC ATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATC

		GATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCT GGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGA CACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACT ACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCG GCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGC AGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCAC TGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGA ATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGT CTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAG GCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGC TACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCC AGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCG GATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAACTG TCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAG GGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTG ATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTG GCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGA AGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGT ACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGG CTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATC TGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGG CTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCA GAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATC TGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACT GAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGG GGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGAT CCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA

178	Secuencia de nucleótidos, cadena de botón Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-254)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGG ATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTA GTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGC TAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACC CCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAG CCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGT GGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCT GCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGG AAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGA GCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGG GCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGA TCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGG CTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAG GACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTA CTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGC CGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCT GCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGC ACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCG GAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCT GTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAG AGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGC GCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATT CCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
80	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera DP47	véase la tabla 18

179	cadena de ojal Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEG GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
180	cadena de botón Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
82	cadena ligera DP47	véase la tabla 18

Tabla 28: Secuencias de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene ligando 4-1BB (71-248) humano no dirigido monovalente; control E

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
171	4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 25
172	4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1	véase la tabla 25
79	cadena de ojal Fc DP47	véase la tabla 18
80	cadena ligera DP47	véase la tabla 18
173	4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL cadena	véase la tabla 25

	de botón Fc	
174	4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1	véase la tabla 25
81	cadena de ojal Fc DP47	véase la tabla 18
82	cadena ligera DP47	véase la tabla 18

2.3 Preparación de IgG1 humana no dirigida como control F

Una molécula de control adicional usada en los ensayos fue un DP47 no dirigido, control de línea germinal, IgG1 humana, que contiene las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala, para anular la unión a receptores gamma Fc de acuerdo con el procedimiento descrito en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2012/130831).

La tabla 29 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de PGLALA huIgG1 DP47 no dirigido (control F).

Tabla 29: Secuencias de DP47 huIgG1 no dirigido (control F)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
181	Secuencia de nucleótidos, cadena pesada DP47 (PGLALA hu IgG1)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGG ATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTA GTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGC TAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

80	cadena ligera DP47	véase la tabla 18
182	cadena pesada DP47 (PGLALA hu IgG1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
82	cadena ligera DP47	véase la tabla 18

2.4 Producción de construcciones y moléculas de control de fusión Fc de ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido a FAP (4B9) monovalente y bivalente

Las secuencias codificantes de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido dirigido y no dirigido se clonaron en un vector plásmido, que dirige la expresión del inserto a partir de un promotor MPSV y contiene una secuencia poliA sintética localizada en el extremo 3' del CDS. Además, el vector contiene una secuencia de EBV OriP para el mantenimiento episomal del plásmido.

Se produjo la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamífero usando polietilenimina. Se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión. Para las construcciones 2.1, 2.2, 2.4 y 2.5 y las moléculas de control correspondientes, se usó una proporción de 1:1:1:1 (por ejemplo, "vector ligando dimérico-CL-cadena de botón": "vector fusión de ligando monomérico-CH1": "vector Fab anti-FAP-cadena de ojal": "vector cadena ligera anti-FAP"). Para las construcciones 2.3 y 2.6 y su molécula de control, se tomó una proporción de 1:1:1 ("vector cadena de ligando dimérico de ojal Fc de huIgG1": "vector cadena de ligando monomérico de botón Fc de huIgG1": "vector cadena ligera anti-FAP"). Las IgG humanas, usadas como control en el ensayo, se produjeron como para las construcciones biespecíficas (para la transfección solo se usaron un vector para la cadena ligera y un vector para la cadena pesada.

Para la producción en matraces de agitación de 500 mL, se sembraron 300 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, se centrifugaron las células durante 10 minutos a 210 x g y se reemplazó el sobrenadante por 20 mL de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión (200 µg de ADN total) se mezclaron en 20 mL de medio CD CHO. Después de la adición de 540 µL de PEI, la solución se agitó en vórtex durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, se mezclaron las células con la solución ADN/PEI, se transfirieron a un matraz de agitación de 500 mL y se incubó durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 160 mL de medio Excell suplementado con L-glutamina 6mML, 5g/L de PEPSOY y ácido valproico 1,2 mM y se cultivaron las células durante 24 horas. Un día después de la transfección se añadieron un 12 % de Feed 7 y glucosa (concentración final 3g/L). Después de cultivarse durante 7 días, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación durante 30-40 minutos al menos 400 x g. La solución se filtró en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm), se suplementó con acida sódica hasta una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantuvo en 4 °C.

La molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando de TNF dirigido o no dirigido y la IgG1 humana se purificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, se cargó el sobrenadante en una columna MabSelect Sure (CV = 5-15 mL, resina de GE Healthcare) equilibrado con fosfato de sodio (20 mM), tampón de citrato de sodio (20 mM) (pH 7,5). La proteína no unida se eliminó lavando con al menos 6 volúmenes de columna del mismo tampón. La proteína unida se eluyó usando un gradiente lineal (20 CV) o una elución escalonada (8 CV) con citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, tampón de glicina 100 mM (pH 3,0). Para el gradiente lineal, se aplicó una elución escalonada adicional de 4 volúmenes de columna.

El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/10 (v/v) de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0. La proteína se concentró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, solución Tween20 al 0,01 % (v/v) de pH 6,0.

Se determinó la concentración de proteína midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando un coeficiente de

extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos. La pureza y el peso molecular de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dirigido se analizaron mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con Coomassie SimpleBlue™ SafeStain (Invitrogen USA) o CE-SDS usando Caliper LabChip GXII (Perkin Elmer). Se analizó el contenido en agregado de las muestras usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN3 al 0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7 a 25 °C.

La **tabla 30** resume el rendimiento y el contenido final de monómero de las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido y no dirigido a FAP(4B9 y las moléculas de control.

Tabla 30 Análisis bioquímico de las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido y no dirigido a FAP (4B9) y las moléculas de control

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
Construcción 2.1	95	15,8
Construcción 2.3	97	11,5
Construcción 2.4	97	14,1
Construcción 2.5	100	16,5
Control C (bivalente)	98	12,6
Control E (monovalente)	93	4,1
Control F (línea germinal PD47, IgG1 PGLALA humana)	100	50

Ejemplo 3

Preparación, purificación y caracterización de 4-1BB

Las secuencias de ADN que codifican los ectodominios de 4-1BB humano, de ratón o de macaco cangrejero (tabla 31) se subclonaron sin cambio de pauta de lectura con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant et al., 1998). Se introdujo un sitio de escisión de proteasa AcTEV entre un ectodominio de antígeno y la Fc de IgG1 humana. Se introdujo una marca Avi para la biotinilación dirigida en el extremo C del botón antígeno-Fc. La combinación de la cadena de botón antígeno-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, con una cadena de ojal Fc que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V permite la generación de un heterodímero que incluye una sola copia de la cadena que contiene el ectodominio 4-1BB, creando por tanto una forma monomérica de antígeno unido a Fc (figura 5C). La tabla 32 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos y ADNc de las construcciones de fusión Fc de antígeno.

Tabla 31: Numeración de aminoácidos de ectodominios de antígeno (ECD) y su origen

SEQ ID NO:	Construcción	Origen	ECD
83	4-1BB ECD humano	Sintetizado de acuerdo con Q07011	aa 24-186
84	4-1BB ECD de macaco cangrejero	aislado de la sangre de macaco cangrejero	aa 24-186
85	4-1BB ECD murino	Sintetizado de acuerdo con P20334	aa 24-187

Tabla 32: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de moléculas de fusión (kih) de Fc antígeno monomérico

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
86	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc	GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG

		AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
87	Secuencia de nucleótidos, cadena de botón Fc de antígeno 4-1BB humano	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCACCTTC TGCGACAACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCCCTGCCC CCCCAACAGCTTCAGCTCTGCCGGCGGACAGCGGACCT GCGACATCTGCAGACAGTGCAAGGGCGTGTTCAGAACC CGGAAAGAGTGCAGCAGCACCAGCAACGCCGAGTGCGA CTGCACCCCCGGCTTCCATTGTCTGGGAGCCGGCTGCAG CATGTGCGAGCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAACTGA CCAAGAAGGGCTGCAAGGACTGCTGCTTCGGCACCTTC AACGACCAGAAGCGGGGCATCTGCCGGCCCTGGACCAA CTGTAGCCTGGACGGCAAGAGCGTGCTGGTCAACGGCA CCAAAGAACGGGACGTCGTGTGCGGCCCCAGCCCTGCT GATCTGTCTCCTGGGGCCAGCAGCGTGACCCCTCCTGCC CCTGCCAGAGAGCCTGGCCACTCTCCTCAGGTCGACGAA CAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAGAC AAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTC CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGA ACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACGAG
88	Secuencia de nucleótidos, cadena de botón Fc de antígeno 4-1BB de macaco cangrejero	TTGCAGGATCTGTGTAGTAACTGCCCAGCTGGTACATTC TGTGATAATAACAGGAGTCAGATTTGCAGTCCCTGTCCT CCAAATAGTTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAGGACCTGT GACATATGCAGGCAGTGTAAAGGTGTTTTCAAGACCAG GAAGGAGTGTTCCTCCACCAGCAATGCAGAGTGTGACT GCATTTCAGGGTATCACTGCCTGGGGGCAGAGTGCAGC ATGTGTGAACAGGATTGTAAACAAGGTCAAGAATTGAC

		AAAAAAAGGTTGTAAAGACTGTTGCTTTGGGACATTTAA TGACCAGAAACGTGGCATCTGTCGCCCCTGGACAAACT GTTCTTTGGATGGAAAGTCTGTGCTTGTGAATGGGACGA AGGAGAGGGACGTGGTCTGCGGACCATCTCCAGCCGAC CTCTCTCCAGGAGCATCCTCTGCGACCCCGCCTGCCCCT GCGAGAGAGCCAGGACACTCTCCGCAGGTCGACGAACA GTTATATTTTCAGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAGACAA AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT GGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA CCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGAA CGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACGAG
89	cadena de botón Fc de antígeno 4-1BB murino	GTGCAGAACAGCTGCGACAACTGCCAGCCCGGCACCTT CTGCCGGAAGTACAACCCCGTGTGCAAGAGCTGCCCCC CCAGCACCTTCAGCAGCATCGGCGGCCAGCCCAACTGC AACATCTGCAGAGTGTGCGCCGGCTACTTCCGGTTCAAG AAGTTCTGCAGCAGCACCCACAACGCCGAGTGCGAGTG CATCGAGGGCTTCCACTGCCTGGGCCCCCAGTGCACCAG ATGCGAGAAGGACTGCAGACCCGGCCAGGAACTGACCA AGCAGGGCTGTAAGACCTGCAGCCTGGGCACCTTCAAC GACCAGAACGGGACCGGCGTGTGCCGGCCTTGGACCAA TTGCAGCCTGGACGGGAGAAGCGTGCTGAAAACCGGCA CCACCGAGAAGGACGTCGTGTGCGGCCCTCCCGTGGTGT CCTTCAGCCCTAGCACCACCATCAGCGTGACCCCTGAAG GCGGCCCTGGCGGACACTCTCTGCAGGTCCTGGTCGACG AACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAG ACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC

		TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCT GAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACG AG
90	cadena de ojal Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
91	cadena de botón Fc de antígeno 4-1BB humano	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDI CRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQ DCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDG KSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHS PQVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
92	cadena de botón Fc de antígeno 4-1BB de macaco cangrejero	LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDIC RQCKGVFKTRKECSSTSNAECDCISGYHCLGAECSMCEQD CKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGK SVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSP QVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
93	cadena de botón Fc de antígeno 4-1BB murino	VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNCNIC RVCAGYFRFKKFCSSTHNAECECIEGFHCLGPQCTRCEKDC RPGQELTKQGCKTCSLGTFNDQNGTGVCRPWTNCSLDGR SVLKTGTTEKDVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSLQ VLVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE

Todas las secuencias codificantes de molécula de fusión 4-1BB- Fc se clonaron en un vector plásmido, que dirige la expresión del inserto a partir de un promotor MPSV y contiene una secuencia de señal poliA sintética localizada en el extremo 3' del CDS. Además, el vector contiene una secuencia de EBV OriP para el mantenimiento episomal del plásmido.

Para la preparación de las moléculas de fusión Fc/antígeno monoméricas biotiniladas, se cotransfectaron células HEK293 EBNA en suspensión en crecimiento exponencial con tres vectores que codifican los dos componentes de la proteína de fusión (cadenas botón en ojal), así como BirA, una enzima necesaria para la reacción de biotinilación. Los vectores correspondientes se usaron en una proporción 2: 1: 0,05 ("botón ECD-AcTEV-Fc de

antígeno": "ojal Fc": "BirA").

Para la producción de proteínas en matraces de agitación de 500 ml, se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 210 g y el sobrenadante se reemplazó por medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se resuspendieron en 20 ml de medio CD CHO que contenía 200 µg de ADN vector. Después de la adición de 540 µl de polietilenimina (PEI), la solución se agitó en vórtex durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, se mezclaron las células con la solución ADN/PEI, se transfirieron a un matraz de agitación de 500 mL y se incubó durante 3 horas a 37°C en una incubadora con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 160 ml de medio F17 y las células se cultivaron durante 24 horas. El medio de producción se complementó con kifunensina 5µM. Un día después de la transfección, se añadió ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 % con suplementos al cultivo. Después de cultivar durante 7 días, se recogió el sobrenadante de las células mediante sedimentación por centrifugado durante 15 min a 210 x g. La solución se filtró en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm), se complementó con acida sódica hasta una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantuvo a 4 °C.

Las proteínas secretadas se purificaron de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A, seguida de una cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, se cargó el sobrenadante en una columna HiTrap Protein A HP (VC = 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 40 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH7,5. Se retiró la proteína no unida lavando con al menos 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, tampón que contenía cloruro de sodio 0,5 M, (pH 7,5). La proteína unida se eluyó usando un gradiente de pH lineal de cloruro de sodio (de 0 a 500 mM) creado sobre 20 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, Tween-20 al 0,01 % (v/v), pH 3,0. A continuación, se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, Tween-20 al 0,01 % (v/v), pH 3,0.

El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/40 (v/v) de Tris 2 M, pH 8,0. La proteína se concentró y se filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con MOPS2 mM, cloruro de sodio 150 mM, solución de azida sódica al 0,02 % (p/v) de pH 7,4.

Para la determinación de la afinidad por el receptor humano, el ectodominio de 4-1BB humano también se subclonó sin cambio de pauta de lectura con una marca avi (GLNDIFEAQKIEWHE) y una hexahistidina.

La producción de proteínas se realizó como se describe anteriormente para la proteína de fusión Fc. Las proteínas secretadas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares mediante cromatografía quelante, seguida de cromatografía de exclusión por tamaño. La primera etapa cromatográfica se realizó en un cartucho NiNTA Superflow (5 ml, Qiagen) equilibrado en fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 nM, pH 7,4. La elución se realizó aplicando un gradiente sobre un volumen de 12 columnas desde el 5 % al 45 % de tampón de elución (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 nM, imidazol 500 mM, pH 7,4). La proteína se concentró y se filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 75 (GE Healthcare) equilibrada con MOPS2 mM, cloruro de sodio 150 mM, solución de azida sódica al 0,02 % (p/v) de pH 7,4 (tabla 33).

Tabla 33: Secuencias de molécula de 4-1BB humano monomérico His

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
94	Secuencia de nucleótidos, 4-1BB humano His	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCACCTTCTG CGACAACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCCCTGCCCCCCC AACAGCTTCAGCTCTGCCGGCGGACAGCGGACCTGCGACA TCTGCAGACAGTGCAAGGGCGTGTTCAGAACCCGGAAAGA GTGCAGCAGCACCAGCAACGCCGAGTGCGACTGCACCCCC GGCTTCCATTGTCTGGGAGCCGGCTGCAGCATGTGCGAGC AGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAACTGACCAAGAAGGGCT GCAAGGACTGCTGCTTCGGCACCTTCAACGACCAGAAGCG GGGCATCTGCCGGCCCTGGACCAACTGTAGCCTGGACGGC AAGAGCGTGCTGGTCAACGGCACCAAAGAACGGGACGTCG TGTGCGGCCCCAGCCCTGCTGATCTGTCTCCTGGGGCCAGC AGCGTGACCCCTCCTGCCCCTGCCAGAGAGCCTGGCCACTC TCCTCAGGTCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCAG GCCTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATCGAGTGGCA CGAGGCTCGAGCTCACCACCATCACCATCAC

95	4-1BB humano His	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICR QCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCK QGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLV NGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQVDEQL YFQGGSGLNDIFEAQKIEWHEARAHHHHHH

Ejemplo 4

Caracterización bioquímica de la molécula de unión a antígeno de fusión Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP mediante resonancia de plasmón superficial

La unión de moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP a 4-1BB recombinante se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se realizaron en un Biacore T100 a 25 °C con HBS-EP como tampón de migración (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo/Alemania).

La avidez de la interacción entre las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido o no dirigido a FAP y 4-1BB recombinante (humano, de macaco cangrejero y murino) se determinó como se describe a continuación. Los datos demostraron que tanto las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen trímeros del ligando 4-1BB dirigido, así como las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen trímeros del ligando 4-1BB de DP47 no dirigido se unen con avideces comparables a las del 4-1BB humano y de macaco cangrejero, pero insignificante para el homólogo de ratón.

Las moléculas de fusión (kih) de Fc 4-1BB de macaco cangrejero y murino, humano biotinilado recombinante se acoplaron directamente en un chip SA usando las instrucciones de acoplamiento estándar (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 30 UR. Las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP, o los controles no dirigidos a DP47, se pasaron a un intervalo de concentración de 0,39 a 200 nM con un flujo de 30 µL/minuto a través de las células de flujo por más de 120 segundos. Se supervisó la disociación durante 180 segundos. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en una cubeta de lectura de referencia vacía.

Para la medición de la afinidad, se realizó el acoplamiento directo de alrededor de 7200 unidades de resonancia (UR) de un anticuerpo específico Fc antihumano en un chip CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina estándar (GE Healthcare). Se capturaron moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contenían un trímero de ligando 4-1BB dirigido o no dirigido a FAP, a 50 nM con un caudal de 30 µl/min durante 60 segundos en la cubeta de lectura 2. Se pasaron series de dilución (1,95 a 1000 nM) de 4-1BB-avi-His humano en ambas cubetas de lectura a 30 µl/min durante 180 segundos para registrar la fase de asociación. Se supervisó la fase de disociación durante hasta 180 s y se activó cambiando de la solución de muestra a HBS-EP. La superficie del chip se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble de 60 s de glicina-HCl 10 mM, pH2,1. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en la cubeta de lectura de referencia 1. Para la interacción entre las moléculas de unión a antígeno de fusión de (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB y 4-1BB hu avi His, las constantes de afinidad se derivaron de las constantes de velocidad ajustando una curva de unión de Langmuir 1:1 usando el software Biaeval (GE Healthcare).

Tabla 34: Ajustes a las constantes de afinidad y unión de Langmuir 1:1

Ligando	Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
trímero 4-1BBL dividido de FAP (construcción 1.1)	**4-1BB hu**	4,8E+04	2,6E-02	**5,5E-07**
trímero 4-1BBL dividido de DP47 (control A)	**4-1BB hu**	6,2E+04	3,3E-02	**5,2E-07**

Ejemplo 5

Caracterización funcional de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido

5.1. Unión en PMBC humanas indiferenciadas frente a activadas de las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen trímeros del ligando 4-1BB dirigido a FAP

Se obtuvieron capas leucocitarias del centro de donación de sangre de Zúrich. Para aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) frescas, la capa leucocitaria se diluyó con el mismo volumen de DPBS (Gibco de Life Technologies, n.º de cat. 14190 326). Se suministraron tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL (TPP, n.° de

cat. 91050) con 15 mL de Histopaque 1077 (SIGMA Life Science, n.° de cat. 10771, polisucrosa y diatrizoato de sodio, ajustados a una densidad de 1,077 g/mL) y la solución de capa leucocitaria diluida se estratificó sobre el Histopaque 1077. Los tubos se centrifugaron durante 30 minutos a 400 x g. A continuación, se recogieron las PBMC de la interfaz, se lavaron tres veces con DPBS y se resuspendieron en medio de linfocitos T que consistía en medio RPMI 1640 (Gibco de Life Technology, n.º de cat. 42401-042) suministrado con suero bovino fetal al 10 % (FBS, Gibco by Life Technology, n.º de cat. 16000-044, lote 941273, irradiado con rayos gamma, sin micoplasmas e inactivado por calor a 56 °C durante 35 min), GlutaMAX-I al 1 % (v/v) (GIBCO de Life Technologies, n.º de cat. 35050 038), piruvato de sodio 1 mM (SIGMA, n.º de cat. S8636), 1 % (v/v) de aminoácidos no esenciales MEM (SIGMA, n.º de cat. M7145) y 50 µM de β-mercaptoetanol (SIGMA, M3148).

Las PBMC se usaron directamente después del aislamiento o se estimularon para inducir la expresión de 4-1BB en la superficie celular de los linfocitos T y NK mediante el cultivo durante 4 días en medio de linfocitos T suplementado con 200 U/mL de proleucina (Novartis Pharma Schweiz AG, CHCLB-P-476-700-10340) y 2 µg/mL de PHA-L (SIGMA, n.º de cat. L2769) en una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos y a continuación, 1 día en una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos recubierta con 10 ug/mL de CD3 antihumano (clon OKT3, BioLegend, n.º de cat. 317315) y 2 µg/mL de CD28 antihumano (clon CD28.2, BioLegend, n.º de cat.: 302928) en medio de linfocitos T a 37 °C y CO_2 al 5 %.

Para determinar la unión de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímeros de 4-1BBL a PBMC humanas, 0,1 x 10^6 PBMC indiferenciadas o activadas se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de célula en suspensión de fondo redondo (Greiner bio-one, cellstar, n.º de cat. 650185). Las placas se centrifugaron durante 4 minutos a 400 x g y a 4 °C. Se descartó el sobrenadante. Posteriormente, las células se tiñeron en 100 µL/pocillo de DPBS que contenía un kit de tinción de células muertas azul fijable VIVO/MUERTO diluido de 1:1000, para excitación UV (Life Technologies, Molecular Probes, L-23105) o colorante de viabilidad fijable eF660 (eBioscience 65-0864-18) o un kit de tinción de células muertas verde fijable VIVO/MUERTO (Life Technologies, Molecular Probes, L-23101) durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Si se usó DAPI como tinción en vivo/muerto, se omitió esta etapa de tinción. Las células se lavaron una vez con 200 µL de tampón FACS frío (DPBS suministrado con FBS al 2 % (v/v), EDTA 5 mM pH 8 (Amresco, n.º de cat. E177) y azida sódica 7,5 mM (Sigma-Aldrich S2002).

A continuación, se añadieron 50 µL/pocillo de tampón FACS frío a 4 °C que contenía diferentes concentraciones tituladas de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímeros de 4-1BBL y las células se incubaron durante 120 minutos a 4 °C, se lavaron cuatro veces con 200 µL/pocillo de tampón FACS a 4 °C y se volvieron a suspender. Las células se tiñeron adicionalmente con 50 µL/pocillo de tampón FACS frío a 4 °C que contenía 0,67 µg/mL de CD3-PerCP-Cy5.5 antihumano (clon UCHT1, IgG1κ de ratón, BioLegend, n.º de cat. 300430) o 0,16 µL de CD3-PE/Cy7 antihumano (clon SP34-2, IgG1 κ de ratón, BD Pharmingen, n.º de cat. 557749, lote 33324597), 0,67 µg/mL de CD45-AF488 antihumano (clon HI30, IgG1κ de ratón, BioLegend, n.º de cat. 304017) o 0,12 µg/mL de CD56-FITC antihumano (clon NCAM16.2, IgG2bκ de ratón, BD Pharmingen, n.º de cat. 345811) o 1 µL de CD56-APC antihumano (clon B159, IgG1 κ de ratón, BD Pharmingen, n.º de cat. 555518, lote 3098894), 0,25 µg/mL de CD4-BV421 antihumano (clon RPA-T4, IgG1κ de ratón, BioLegend, n.º de cat. 300532) o 0,23 µg/mL de CD4-BV421 antihumano (clon OKT4, IgG2bκ de ratón, BioLegend, n.º de cat. 317434), 0,25 µL de CD8a-APC antihumano (clon RPA-T8, IgG1κ de ratón, BD Pharmingen, n.º de cat. 555369) o 0,67 µL de CD8a-APC/Cy7 antihumano (clon RPA-T8, IgG1κ de ratón, BioLegend, n.º de cat. 301016) o 0,83 ng/mL de CD8a-BV711 antihumano (clon RPA-T8, IgG1κ de ratón, BD Pharmingen, n.º de cat. 301044) y 5 µg/mL de fragmento F(ab')2 de IgG de cabra específico de fragmento Fcγ de IgG antihumana de AffmiPure conjugado con PE (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109 116 098 o 109 116 170). Las células se lavaron dos veces con tampón FACS. Si las células se tiñeron con tintes de viabilidad fijables, se fijaron con 50 µL/pocillo de DPBS que contenía formaldehído al 1 % (Sigma, HT501320-9,5L). Las células se resuspendieron en tampón FACS y se adquirieron al día siguiente o el mismo día usando un LSR-Fortessa de 5 láseres (BD Bioscience con software DIVA) o un analizador cuántico 10 Miltenyi de 3 láseres (Mitenyi Biotec) y Flow Jo (FlowJo X10.0.7). Si se usó tinción DAPI para detectar células muertas, se resuspendieron en 80 µL/pocillo de tampón FACS que contenía 0,2 µg/mL de DAPI (Santa Cruz Biotec, n.º de cat. Sc-3598) y se adquirieron el mismo día usando un LSR-Fortessa de 5 láseres (BD Bioscience con software DIVA).

Como se muestra en la figura 6, las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido o no dirigido a FAP no se unieron a linfocitos T CD4+ humanos en reposo y no mostraron unión detectable a linfocitos T CD8+ en reposo y linfocitos NK. Por el contrario, ambas construcciones se unieron fuertemente a los linfocitos T NK, CD8+ o CD4+ activados, aunque los últimos mostraron una intensidad de fluorescencia específica aproximadamente 10 veces menor en comparación con los linfocitos NK y una intensidad 20 veces menor de fluorescencia específica en comparación con los linfocitos T CD8+.

Las figuras 7A y 7B muestran la unión de las construcciones 1.1 a 1.10 preparadas en el ejemplo 1 en linfocitos T CD3+ CD8+ humanos activados que expresan 4-1BB y linfocitos T CD3+ CD4+ humanos activados que expresan 4-1BB, respectivamente. La tabla 35 muestra los valores de EC_{50} como se mide para las construcciones 1.1 a 1.10.

Tabla 35: Unión a linfocitos T CD3+ CD8+ humanos activados y linfocitos T CD3+ CD4 +

Construcción	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD8$^+$	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD4$^+$
Control B	0,11	16,21
1.1	0,43	4,99
1.2	0,18	20,79
1.3	0,07	2,82
1.4	0,19	0,34
1.5	0,17	2,67
1.6	0,19	0,95
1.7	0,26	16,47
1.8	0,14	2,77
1.9	0,18	12,92
1.10	0,12	0,3

Las figuras 8A y 8B muestran la unión de las Construcciones 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6 preparadas en el ejemplo 2 en CD4+ y CD8+ de sangre humana fresca y en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ que expresan 4-1BB activados, respectivamente. Las puertas se establecieron en linfocitos T CD45+ CD3+ CD4+ o CD45+ CD3+ CD8+ vivos y el MFI del fragmento F(ab')2 de cabra específico del fragmento Fcγ de IgG antihumana de AffmiPure conjugado con PE se transfirieron frente a la concentración titulada de variantes de fusión Fc de ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido. La tabla 36 muestra los valores de EC_{50} como se mide para las construcciones 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6.

Tabla 36: Unión a linfocitos T CD4+ activados que expresan 4-1BB y linfocitos T CD8+

Construcción	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD8$^+$	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD4$^+$
Control B	0,36	0,42
Control C	0,39	0,41
Control E	0,57	0,76
2.1	0,21	0,24
2.3	0,44	0,3
2.4	0,3	0,38
2.5	0,35	0,68
2.6	0,33	0,24

5.2 Unión de la molécula de unión a antígeno de fusión Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP a esplenocitos de ratón activados

Se recogieron bazos de ratón en 3 mL de PBS y se generó una suspensión de células individuales usando tubos MACS suaves (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-096-334) y un disociador Octo MACS suave (Miltenyi Biotec). Posteriormente, los esplenocitos se filtraron a través de filtros de separación previa de 30 µm (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-041-407) y se centrifugaron durante 7 minutos a 350 x g y 4 °C. Se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 suministrado con FBS al 10 % (v/v), GlutaMAX-I al 1 % (v/v), piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales de MEM al 1 % (v/v), β-mercaptoetanol 50 µM y penicilina-estreptomicina al 10 % (SIGMA, n.º de cat. P4333). 10^6 células/mL se cultivaron durante 2 días en una placa de cultivo tisular de 6 pocillos recubiertos con 10 µg/mL de IgG de hámster armenio anti-CD3ε de ratón (clon 145-2C11, BioLegend, n. de cat. 100331) y 2 µg/mL de IgG de hámster sirio anti-CD28 de ratón (clon 37.51, BioLegend, n.º de cat. 102102).

Se recogieron esplenocitos de ratón activados, se lavaron en DPBS, se contaron y 0,1 x 10^6 células se transfirieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos tratada de cultivo no tisular de fondo en U. Se eliminó el sobrenadante y las células se tiñeron en 100 µL/pocillo de DPBS que contenía tinte de viabilidad fijable eF660 diluido a 1:5000 (Bioscience, n.º de cat. 65-0864-18) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron con PBS y se tiñeron en 50 uL de tampón FACS que contenía diferentes concentraciones de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP (trímero 4-1BBL dividido de FAP), moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB no dirigido (trímero 4-1BBL dividido de DP47) o mAb P329G LALA de IgG1 humana de CD137 anti-ratón (clon Lob. 12.3, # de catálogo de BioXcell: BE0169). Las células se incubaron durante 120 minutos a 4 °C. Las células se lavaron cuatro veces con tampón FACS y se tiñeron en 50 µL/pocillo de tampón FACS que contenía 10 µg/mL de bloque IgG-Fc de rata de anti-CD16/CD32 de ratón purificado (BD Pharmingen, n.º de cat. 553142, clon 2.4G2), 5 µg/mL de IgG2bκ -FITC de rata de anti-CD8b

de ratón (BioLegend, n.º de cat. 126606, clon YTS156.7.7), 0,67 µg/mL de IgG2bκ -APC-Cy7 de rata anti-CD3 de ratón (BioLegend, n.º de cat. 100222, clon 17A2), 0,67 µg/mL de IgG2bκ -PE-Cy7 de rata de anti-CD4 de ratón (BioLegend, n.º de cat. 100422, clon GK1.5), 2 µg/mL de (C3H x BALB/c) IgG2aκ PerCp-Cy5,5 de ratón anti-NK1,1 de ratón (BioLegend, n.º de cat. 108728, clon PK136) y 10 µg/mL de anti-IgG humana caprino de fragmento F(ab')2 policlonal de AffmiPure conjugado con PE, fragmento Fcγ específico, reacción cruzada mínima con proteínas de suero de conejo y ratón bovino (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109-116-170) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 200 µL/pocillo de tampón FACS frío. Las células se fijaron dos veces con 50 µL/pocillo de DPBS que contiene formaldehído al 1 %. Las células se resuspendieron en tampón FACS y se adquirieron al día siguiente usando un LSR-Fortessa de 5 láseres (BD Bioscience con software DIVA).

Como se muestra en la figura 9, moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB hu dirigido a FAP (trímero de 4-1BBL hu dividido de FAP) y moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB hu no dirigido (trímero de 4-1BBL hu dividido de DP47) no se unen al 4-1BB de ratón. Por lo tanto, la actividad no se puede someter a prueba en ratones inmunocompetentes. Para los estudios de modo de acción in vivo, se deben usar modelos de ratón humanizados en ratones inmunocompetentes o sustitutos que contienen trímeros de 4-1BBL de ratón como se muestra en la figura 3.

5.3 Unión a células tumorales que expresan FAP

Para ensayos de unión en células que expresan FAP, se usó la línea celular de melanoma humano MV-3 (véase Ruiter et al., Int. J. Cancer 1991, 48(1), 85-91), WM-266-4 (ATTC CRL-1676) o la línea celular del clon 39 de NIH/3T3-huFAP. Para generar la última línea celular, se transfectaron células NIH/3T3 con FAP humana (clon 39 de NIH/3T3-huFAP). Las células se generaron por transfección de células NIH/3T3 de fibroblasto embrionario de ratón (ATCC CRL-1658) con el plásmido de expresión pETR4921 que codifica FAP humana bajo un promotor de CMV. Las células se mantuvieron en presencia de 1,5 µg/mL de puromicina (InvivoGen, n.º de cat.: ant-pr-5). Se añadieron 0,1 x 10^6 de células tumorales que expresan FAP a cada pocillo de placas de suspensión de 96 pocillos de fondo redondo (Greiner bio-one, cellstar, n.º de cat. 650185). Las células se lavaron una vez con 200 µL de DPBS y se resuspendieron los sedimentos. Se añadieron 100 µL/pocillo de tampón DPBS frío a 4 °C que contiene tinte de viabilidad fijable eFluor 450 (eBioscience, n.º de catálogo 65-0863-18) diluido a 1:5000 o tinte de viabilidad fijable eFluor 660 (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 de tampón DPBS frío a 4 °C y se resuspendieron en 50 µL/pocillo de tampón FACS frío a 4 °C (DPBS suministrado con FBS al 2 % (v/v), EDTA 5 mM pH8 (Amresco, n.º de cat. E177) y azida sódica 7,5 mM (Sigma-Aldrich S2002) que contiene diferentes concentraciones de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímeros de 4-1BBL tituladas, seguido de incubación durante 1 hora a 4 °C. Después de lavar cuatro veces con 200 µL/pocillo, las células se tiñeron con 50 µL/pocillo de tampón FACS frío a 4 °C que contenía 30 µg/mL de fragmento $F(ab')_2$ caprino específico del fragmento Fcγ de anti -IgG humana de AffiniPure conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109-096-098) o 5 µg/mL de fragmento F(ab')2 caprino específico del fragmento Fgγ de anti-IgG humana de AffiniPure conjugado con PE (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109-116-098 o 109- 116-170) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 200µL de tampón FACS a 4 °C y a continuación, se resuspendieron en 50 µL/pocillo de DPBS que contenía formaldehído al 1 %. El mismo día o al día siguiente las células se resuspendieron en 100 µL de tampón FACS y se adquirieron usando LSR-Fortessa de 5 láseres (BD Bioscience con software DIVA) o Miltenyi Quant Analyzer 10 de 3 láseres (Mitenyi Biotec) y Flow Jo (FlowJo X 10.0.7).

Como se muestra en la figura 10, la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP (trímero de 4-1BBL dividido de FAP), construcción 1.1, pero no la construcción no dirigida, que contiene DP47-Fab (trímero de 4-1BBL dividido de DP47), control A, se unió eficazmente a células (10A) MV-3 de melanoma que expresan proteína de activación de fibroblastos humanos (FAP) o células (10B) WM-266-4.

La figura 11A muestra la unión de las construcciones 1.1 a 1.10 como se preparan en el ejemplo 1 a células MV-3 de melanoma humano que expresan FAP humana y en la figura 11B se presenta la unión de las construcciones 1.1, 1.2, 1.3 y 1.5 a células de fibroblasto embrionario de ratón transfectado del clon 39 de NIH/3T3-huFAP que expresan FAP humana. La tabla 37 muestra los valores de EC_{50} como se mide para las construcciones 1.1 a 1.10.

Tabla 37: Unión a células tumorales que expresan FAP humana

Construcción	EC_{50} [nM] FAP^+ MV-3	EC_{50} [nM] FAP NIH/3T3-hu
1.1	4,14	12,2
1.2	5,36	9,35
1.3	-	14,97
1.4	5,13	-
1.5	0,53	10,06

1.6	8,16	-
1.7	4,09	-
1.8	2,79	-
1.9	4,22	-
1.10	4,31	-

La figura 12 muestra la unión de diferentes construcciones (kih) de Fc ligando de 4-1BB humano trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP (4B9) a células MV-3 de melanoma humano que expresan FAP humana (figura 12A) y células WM-266-4 (figura 12B). Las construcciones 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6 se prepararon como se describe en el ejemplo 2 y los controles se prepararon como se describe anteriormente en el presente documento. Se establecieron puertas en células tumorales vivas y se transfirieron MFI de fragmento F(ab')2 caprino específico de fragmento Fcγ anti-IgG humana de AffiniPure conjugado con PE frente a la concentración titulada de construcciones de fusión Fc de ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido. La tabla 38 muestra los valores de EC_{50} como medidos.

Tabla 38: Unión a células tumorales que expresan FAP humana

Construcción	EC_{50} [nM] FAP^+ MV-3	EC_{50} [nM] FAP^+ WM-266-4
2.1	1,66	0,99
2.3	0,53	0,42
2.4	0,83	0,59
2.5	1,66	1,2

5.4 Caracterización funcional de las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido murino

5.4.1 Unión a esplenocitos de ratón activados

Se recogieron bazos de ratón en 3 mL de PBS y se generó una suspensión de células individuales usando tubos MACS suaves (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-096-334) y un disociador Octo MACS suave (Miltenyi Biotec). Posteriormente, los esplenocitos se filtraron a través de filtros de separación previa de 30 µm (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-041-407) y se centrifugaron durante 7 minutos a 350 x g y 4 °C. Se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 suministrado con FBS al 10 % (v/v), GlutaMAX-1 al 1 % (v/v), piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales de MEM al 1 % (v/v), β-mercaptoetanol 50 µM.

Para la unión a esplenocitos de ratón frescos se usaron directamente células. Para inducir la expresión de 4-1BB de ratón en células T, los esplenocitos de ratón se activaron como sigue: 10^6 células/mL se cultivaron durante 2 días en una placa de cultivo tisular de 6 pocillos recubiertos con 10 µg/mL de IgG de hámster armenio anti-CD3ε de ratón (clon 145-2C11, BioLegend, n. de cat. 100331) y 2 µg/mL de IgG de hámster sirio anti-CD28 de ratón (clon 37.51, BioLegend, n.º de cat. 102102).

Se recogieron esplenocitos de ratón fresco o esplenocitos de ratón activados, se lavaron en DPBS (Gibco Life technologies, n.º de cat. 14190-136), se contaron y 0,1 x 10^6 células se transfirieron a cada pocillo de una placa tratada de 96 pocillos de fondo en U de cultivo no tisular (Greiner bio-one, cell star, n.º de cat. 650185). Se eliminó el sobrenadante y las células se tiñeron en 100 µL/pocillo de DPBS frío a 4 °C que contenía el kit de tinción de células muertas Aqua fijable VIVO/MUERTO diluido en 1:1000 (Life Technologies, L34957) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron con DPBS frío y se tiñeron en 50 uL/pocillo de tampón FACS frío (DPBS suministrado con FBS al 2 % (v/v), EDTA 5 mM pH 8 (Amresco, n.º de cat. E177) y azida sódica 7,5 mM (Sigma- Aldrich S2002)) que contiene diferentes concentraciones de moléculas de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB de ratón o control de isotipo de IgG1 κ de ratón (BioLegend, n.º de cat. 400153, clon MOPG21). Las células se incubaron durante 120 minutos a 4 °C, se lavaron cuatro veces con DPBS frío y se tiñeron en 50 µL/pocillo de tampón FACS frío que contenía 30 µg/mL de F(ab')2 de IgG caprino específico de Fc gamma de anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Jackson Inmunoresearch, n.º de cat. 115-096-071) durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con DPBS frío y se tiñeron con 50 µL/pocillo de tampón FACS suministrado con 10 µg/mL de bloque de IgG-Fc de rata de anti-CD16/CD32 de ratón purificado (BD Pharmingen, n.º de cat. 553142 clon 2.4G2), 0,67 µg/mL de anti-CD8a-APC-Cy7 de ratón (BioLegend, n.º de cat. 100714, clon 53-6.7), 0,67 µg/mL de anti-CD3ε-PerCP-Cy5,5 de ratón (BioLegend, n.º de cat. 100328, clon 145-2C11), 0,67 µg/mL de IgG2bκ-PE-Cy7 de rata anti-CD4 de ratón (BioLegend, n.º de cat. 100422, clon GK1.5) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 200 µL/pocillo de DPBS frío, se fijaron con 50 µL/pocillo de DPBS que contenía formaldehído al 1 % y se resuspendieron en tampón FACS. Las células se adquirieron usando MACSQuant Analyzer 10 de 3 láseres (Miltenyi Biotech) y Flow Jo v10.0.7 (FlowJo LLC). Las puertas se establecieron en linfocitos T $CD3^+$ $CD8^+$ o $CD3^+$ $CD4^+$ y la intensidad de fluorescencia media (MFI) de F(ab')2 de

IgG caprino específico de Fc-gamma de anti-IgG de ratón conjugado con FITC se analizó y normalizó mediante la sustracción de la MFI del control en blanco (sin adición de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB de ratón). La MFI se transfirió frente a la concentración de moléculas de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB de ratón usadas para mostrar la unión a la molécula de unión celular de 4-1BB de ratón.

Como se puede observar en la figura 13, las construcciones M.1 y M.2 de 4-1BBL murino, así como las moléculas de control correspondientes Control M.1 y Control M.2 se unen con una afinidad bastante similar a 4-1BB de ratón. La tabla 39 muestra los valores de EC_{50} como se mide para las construcciones M.1 y M.2 y las moléculas de control.

Tabla 39: Unión a linfocitos T CD4+ activados que expresan 4-1BB y linfocitos T CD8+

Construcción	EC_{50} [nM] $4\text{-}1BB^+CD8^+$	EC_{50} [nM] $4\text{-}1BB^+CD4^+$
Control M.1	0,95	0,74
M.1	0,87	0,52
Control M.2	0,78	0,6
M.2	0,54	0,42

5.4.2 Unión a células tumorales que expresan FAP

Para ensayos de unión en células que expresan FAP, se usó la línea celular de melanoma humano MV-3 (véase Ruiter et al., Int. J. Cancer 1991, 48(1), 85-91) y WM-266-4 (ATTC CRL-1676) (el clon 28H1 específico de anti-FAP es de reacción cruzada de ratón/humano). Se añadieron 0,1 x 10^6 de células tumorales que expresan FAP a cada pocillo de placas de suspensión de 96 pocillos de fondo redondo (Greiner bio-one, cellstar, n.º de cat. 650185). Las células se lavaron una vez con 200 µL de DPBS frío y los sedimentos se resuspendieron en 100 µL/pocillo de tampón DPBS frío a 4 °C que contenía el kit de tinción de células muertas Aqua fijable VIVO/MUERTO diluido en 1:1000 (Life Technologies, L34957) y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron una vez con 200 µL de tampón DPBS frío y se resuspendieron en 50 µL/pocillo de tampón FACS frío (DPBS suministrado con FBS al 2 % (v/v), EDTA 5 mM pH 8 (Amresco, n.º de cat. E177) y azida sódica 7,5 (Sigma-Aldrich S2002)) que contiene moléculas de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB murino en una serie de concentraciones seguido de incubación durante 1 hora a 4 °C. Después de lavar cuatro veces con 200 µL de DPBS/pocillo, las células se tiñeron con 50 µL/pocillo de tampón FACS frío a 4 °C que contenía 30 µg/mL de F(ab')2 de IgG caprino específico de Fc-gamma de anti- IgG de ratón conjugado con FITC (Jackson Immunoresearch, n.º de cat. 115-096-071) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 200 µL/pocillo de tampón DPBS frío, se fijaron con 50 µL/pocillo de DPBS que contenía formaldehído al 1 % y se resuspendieron en tampón FACS. Las células se adquirieron usando MACSQuant Analyzer 10 de 3 láseres (Miltenyi Biotech) y Flow Jo v10.0.7 (FlowJo LLC). Las puertas se establecieron en células vivas y la intensidad de fluorescencia media (MFI) de F(ab')2 de IgG caprino específico de Fc-gamma de anti-IgG de ratón conjugado con FITC se analizó y normalizó mediante la sustracción de la MFI del control en blanco (sin adición de molécula de fusión (kih) de Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB de ratón). La MFI se transfirió frente a la concentración de moléculas de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB murino usadas para mostrar la unión a la molécula de unión celular de 4-1BB murino. Como se esperaba, las construcciones M.1 y M.2 de 4-1BBL murino se unen con una afinidad bastante similar a FAP mientras que las moléculas de control no se unen.

La figura 14 muestra la unión de las construcciones M.1 y M.2 de (kih) de Fc ligando de 4-1BB murino trimérico dividido dirigido o no dirigido a FAP a células MV-3 de melanoma humano que expresan FAP humana (figura 14A) y células WM-266-4 (figura 14B). La tabla 40 muestra los valores de EC_{50} como medidos.

Tabla 40: Unión a células tumorales que expresan FAP humana

Construcción	EC_{50} [nM] FAP^+ MV-3	EC_{50} [nM] FAP^+ WM-266-4
M.1	7,26	5,14
M.2	6,9	5,63

Ejemplo 6

Actividad biológica de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido

6.1. Activación de NF-κB en células HeLa que expresan 4-1BB humano

Generación de células HeLa que expresan 4-1BB y NF-κB-luciferasa humanos

La línea celular de carcinoma de cuello uterino HeLa (ATCC CCL-2) se transdujo con un plásmido basado en el vector de expresión pETR10829, que contiene la secuencia de 4-1BB humano (n.º de acceso de Uniprot Q07011) bajo el control de un promotor de CMV y un gen de resistencia a la puromicina. Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con FBS al 10 % (v/v), GlutaMAX-I al 1 % (v/v) y 3 µg/mL de puromicina.

Las células HeLa transducidas con 4-1BB se sometieron a prueba para determinar la expresión de 4-1BB mediante citometría de flujo: 0,2 x 10^6 células vivas se resuspendieron en 100 µL de tampón FACS que contenía 0,1 µg de 4B4-1 de IgG1κ de ratón de 4-1BB antihumano conjugado con PerCP/Cy5,5 (BioLegend n.º de cat. 309814) o su control de isotipo (clon MOPC-21 de anticuerpo de control de isotipo IgG1κ de ratón conjugado con PerCP/Cy5,5, BioLegend n.º de cat. 400150) y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con tampón FACS, se resuspendieron en 300 µL de tampón FACS que contenía 0,06 µg de DAPI (Santa Cruz Biotec, n.º de cat. Sc-3598) y se adquirieron usando un LSR-Fortessa de 5 láseres (BD Bioscience, software DIVA). Se realizaron diluciones limitadas para generar clones individuales como se describe: las células HeLa transducidas con 4-1BB humano se resuspendieron en medio a una densidad de 10, 5 y 2,5 células/ml y se transfirieron 200 µl de suspensiones celulares a placas de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido de fondo redondo (6 placas/concentración celular, TPP n.º de cat. 92697). Los clones individuales se recolectaron, expandieron y sometieron a prueba para la expresión de 4-1BB como se describe anteriormente. El clon con la expresión más alta de 4-1BB (clon 5) se eligió para la transfección posterior con el vector de expresión 5495p translúcido HygB de NF-κB-luciferasa. El vector confiere a las células transfectadas tanto resistencia a la higromicina B como capacidad para expresar luciferasa bajo el control del elemento de respuesta a NF-κB (vector de columna vertebral Panomics, n.º de cat. LR0051 con resistencia introducida a HyB). Se cultivaron células del clon 5 HeLa de 4-1BB humano hasta una confluencia del 70 %. Se añadieron 50 µg (40 µL) de vector de expresión 5495p translúcido HygB linealizado (enzimas de restricción AseI y SalI) a una cubeta Gene Pulser/MicroPulser estéril de 0,4 cm (Biorad, n.º de cat. 165-2081). Se añadieron 2,5 x10^6 células de clon 5 HeLa de 4-1BB humano en 400 µl de medio DMEM libre de suplemento y se mezclaron cuidadosamente con la solución de plásmido. La transfección de las células se realizó usando un sistema total Gene Pulser Xcell (Biorad, n.º de cat. 165-2660) bajo las siguientes configuraciones: pulso exponencial, capacitancia 500 µF, voltaje 160 V, resistencia ∞. Inmediatamente después de que las células transfectadas por pulso se transfirieron a un matraz de cultivo tisular de 75 cm^2 (TPP, n.º de cat. 90075) con 15 mL de medio DMEM caliente a 37 °C suministrado con FBS al 10 % (v/v) GlutaMAX-1 al 1 % (v/v). Al día siguiente, se añadió medio de cultivo que contenía 3 µg/mL de puromicina y 200 µg/mL de higromicina B (Roche, n.º de cat. 10843555001). Las células supervivientes se expandieron y se realizó una dilución limitada como se describe anteriormente para generar clones individuales.

Los clones se sometieron a prueba para determinar la expresión de 4-1BB como se describe anteriormente y para la actividad de la NF-κB-Luciferasa como sigue: los clones se recogieron en medio de selección y se contaron usando un contador celular Vi-cell xr 2.03 (Beckman Coulter, n.º de cat. 731050). Las células se fijaron a una densidad celular de 0,33 x 10^6 células/mL y 150 µL de esta suspensión celular fueron transferidos a cada pocillo de una placa de cultivo tisular estéril de fondo plano de 96 pocillos con tapa (greiner bio-one, n.º de 655083) y, como control, a una placa de cultivo tisular de fondo plano normal de 96 pocillos (TPP, n.º de cat. 92096) para probar la supervivencia y la densidad celular al día siguiente. Las células se incubaron durante la noche a 37 °C y CO_2 al 5 %. Al día siguiente, se añadieron 50 µL de medio que contenía diferentes concentraciones de factor alfa de necrosis tumoral humano recombinante (rhTNF-α, PeproTech, n.º de cat. 300-01A) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos, lo que dio como resultado la concentración final de rhTNF-α de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 0 ng/pocillo. Las células se incubaron durante 6 horas a 37 °C y CO_2 al 5 % y a continuación, se lavaron tres veces con 200 µL/pocillo de DPBS. Se añadió tampón de lisis indicador (Promega, n.º de cat.: E3971) a cada pocillo (40 µl) y las placas se almacenaron durante la noche a -20 °C. Al día siguiente, las placas de células congeladas y el tampón de detección (Luciferase 1000 Assay System, Promega, n.º de cat. E4550) se descongelaron a temperatura ambiente. Se añadieron 100 uL de tampón de detección a cada pocillo y la placa se midió lo más rápido posible usando un lector de microplacas SpectraMax M5/M5e y el software SoftMax Pro (Molecular Devices). Las unidades de luz liberada medidas durante 500 ms/pocillo (URL) por encima del control (sin adición de rhTNF-α) se tomaron como actividad luciferasa. El clon 26 de NF-κB-luc-4-1BB-HeLa que presenta la mayor actividad luciferasa y un nivel considerable de expresión de 4-1BB se eligió para su uso posterior.

Activación de NF-κB en élulas Hela que expresan 4 -1BB humano cocultivadas con células tumorales que expresan FAP

Se recolectaron las células HeLa de 4-1BB humano de NF-κB-luciferasa y se resuspendieron en medio DMEM suministrado con FBS al 10 % (v/v) y GlutaMAX-1 al 1 % (v/v) a una concentración de 0,2 x 10^6 células/ml. 100 µl (2 x 10^4 células) de esta suspensión celular se transfirieron a cada pocillo de una placa de cultivo tisular estéril blanca de 96 pocillos de fondo plano con tapa (greiner bio-one, n.º de cat. 655083) y la placa se incubaron a 37 °C y CO_2 al 5 % durante la noche. Al día siguiente, 50 µL de medio que contiene concentraciones tituladas de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP (trímero de 4-1BBL dividido de FAP) o moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB no

dirigido a DP47 (trímero 4-1BBL dividido de DP47). Las células tumorales que expresan FAP (MV3, WM-266-4 o el clon 39 de NIH/3T3-huFAP) se resuspendieron en medio DMEM suministrado con FBS al 10 % (v/v) y GlutaMAX-1 al 1 % (v/v) a un concentración de 2 x 10^6 células/ml.

Se añadió la suspensión de células tumorales que expresan FAP (50 µl, proporción final 1:5) o solo medio a cada pocillo y las placas se incubaron durante 6 horas a 37 °C y CO_2 al 5 %. Se lavaron las células dos veces con 200 µL/pocillo de DPBS. 40 µl de tampón de lisis indicador de reciente preparación (Promega, n.º de cat.: E3971) se añadieron a cada pocillo y las placas se almacenaron durante la noche a -20 °C. Al día siguiente, las placas de células congeladas y el tampón de detección (Luciferase 1000 Assay System, Promega, n.º de cat. E4550) se descongelaron a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µL de tampón de detección a cada pocillo y se midió la actividad de luciferasa lo más rápido posible usando un lector de microplacas SpectraMax M5/M5e y un software SoftMax Pro (Molecular Devices) contando la emisión de luz en URL (unidades de luz liberada por 0,5s/pocillo) o el lector de placas de contador de marcador múltiple Victor3 1420 (Perkin Elmer) y el software de gestión Perkin Elmer 2030 que cuenta la emisión de luz como recuentos por segundo (CPS) y se transfiere frente a la concentración de las construcciones sometidas a prueba.

La molécula de unión a antígeno de fusión Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP (trímero 4-1BBL dividido de FAP) desencadenó la activación de la vía de señalización de NF-kB en la línea celular indicadora en presencia de células tumorales que expresan FAP. Por el contrario, la variante no dirigida de la misma molécula no logró desencadenar dicho efecto en ninguna de las concentraciones sometidas a prueba (figura 16). Esta actividad de 4-1BBL dirigido dependía estrictamente de la expresión de FAP en la superficie celular de las células tumorales, ya que no se pudo detectar ninguna activación de NF-kB tras el cultivo de la línea celular indicadora de NF-kB con células tumorales negativas para FAP incluso en presencia de la molécula de unión a antígeno de fusión Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP. Las actividades medidas para las construcciones 1.1 a 1.10 se muestran en la figura 17 y los datos medidos para las construcciones 2.1, 2.4 y 2.5 se presentan en la figura 18.

6.2. Activación de NFκB en células HEK T293 que expresan 4-1BB de macaco cangrejero

Generación de células HEK T293 que expresan 4-1BB de macaco cangrejero y NFκB-luciferasa

Para la producción de partículas de tipo vírico (VLP), se transfectó el riñón embrionario humano (HEK) T293/17 (ATCC CRL-11268) usando reactivo LTX Lipofectamine® con reactivo PLUS™ (Life Technologies, n.º de cat. 15338100) con el vector pETR14372 que codifica un casete de gen indicador de NFκB-luciferasa-IRIS-GFP (NFκB-1uc-GFP) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Seis horas más tarde se realizó DMEM suministrado con un 10 % de reemplazo de medio FBS y las VLP se recogieron 4 días después. Se transdujeron células HEK293T frescas a una confluencia del 70-80 % con el pETR14372-VLP producido y polibreno de 4 µg/mL. Las células se cultivaron durante 24 horas y se realizó un intercambio de medio. Se recogieron las células HEK T293/17 transducidas y se realizó una dilución limitada de 1 célula/pocillo para cribar clones individuales estables. Los clones individuales se estimularon con 25 ng/mL de TNF-α (PeproTech Inc., n.º de cat. 300-01 A) en el medio y se cribaron para detectar una señal de GFP positiva a lo largo del tiempo usando el sistema de microscopio de fluorescencia Incuyte Zoom (Essen Bioscience). Posteriormente, las células de registro de señales de GFP se sometieron a prueba para determinar la actividad de luciferasa usando el kit de luciferasa Nano Glo (Promega, N1120) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La actividad de luciferasa se midió usando un lector de placas de contador de marcador múltiple Victor3 1420 (Perkin Elmer) y el software de gestión Perkin Elmer 2030. La emisión de luz se contó en recuentos por segundo (CPS) durante 0,5 s/pocillo. El clon 61 mostró la expresión más alta de GFP y luciferasa después de la activación de TNF-α y se usó adicionalmente para la generación de la línea celular indicadora.

Como se describe anteriormente, se produjeron nuevas VLP usando el vector pETR14879 que codifica 4-1BB de macaco cangrejero y una resistencia a la puromicina y la línea celular del clon 61 de NFκB-fluc-GFP HEK293T se transdujo a una confluencia del 70-80 % con el pETR14879-VLP producido y 4 µg/mL de polibreno. Las células se cultivaron durante 24 horas y se realizó un intercambio de medio. Cuatro días después de la transducción, las células se tiñeron con anticuerpo 4-1BB de reacción cruzada de macaco cangrejero antihumano conjugado con PE (IgG1κ de ratón, clon MOPC-21, BioLegend, n.º de cat. 309804) en DPBS que contenía FBS al 1 %, se clasificaron por FACS (ARIA, BD) y se sembraron con 5 células/pocillo en DMEM provisto de medio FBS al 10 % que contenía 1 µg/mL de puromicina (InvivoGen, n.º de cat. ant-pr). Los clones en crecimiento se sometieron a prueba como se describe para la actividad de GFP y luciferasa después de la estimulación con TNF-α y para una alta expresión de 4-1BB de macaco cangrejero por citometría de flujo. Se eligieron clones doblemente positivos y se sometió a prueba la actividad luficerasa en presencia de la construcción 2.1 dirigida a FAP monovalente o el control B y células MV-3 o WM-266-4 que expresan FAP. Se eligió el clon 61-13 que expresa HEK T293/17-NF-κB-luc-GFP-cy4-1BB para su uso en todos los experimentos posteriores.

Activación de NFκB de las células indicadoras HEK T293/17 que expresan 4-1BB de macaco cangrejero cocultivado con células tumorales que expresan FAP

Se recogieron células del clon 61-13 que expresan HEK T293/17-NFκB-luc-GFP-cy4-1BB y se resuspendieron en medio DMEM suministrado con FBS al 10 % (v/v) y GlutaMAX-I al 1 % (v/v) a un concentración de 0,2 x 10^6 células/mL. 100 µl (2 x 10^4 células) de esta suspensión celular se transfirieron a cada pocillo de una placa de cultivo tisular estéril blanca de 96 pocillos de fondo plano con tapa (greiner bio-one, n.º de cat. 655083) y la placa se incubaron a 37 °C y CO_2 al 5 % durante la noche. Al día siguiente, se añadieron 50 µL de medio que contenía diferentes concentraciones tituladas de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contenían un trímero de ligando 4-1BB dirigido o no dirigido a FAP. Las células tumorales que expresan FAP (MV3 y WM-266-4) se resuspendieron en medio a una concentración de 2 x 10^6 células/ml. Se añadió suspensión de células tumorales que expresan FAP (50 µl) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 6 horas a 37 °C y CO_2 al 5 %. El principio de este ensayo se muestra en la figura 19. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con 200 µL/pocillo de DPBS. 40 µl de tampón de lisis indicador de reciente preparación (Promega, n.º de cat.: E3971) se añadieron a cada pocillo y las placas se almacenaron durante la noche a -20 °C. Al día siguiente, las placas de células congeladas y el tampón de detección (Luciferase 1000 Assay System, Promega, n.º de cat. E4550) se descongelaron a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µL de tampón de detección a cada pocillo y se midió la actividad luciferasa lo más rápido posible usando un lector de microplacas SpectraMax M5/M5e (Molecular Devices) (tiempo de integración de 500 ms, sin filtro que recoja toda la longitud de onda). La emisión de luz se contó en unidades de luz liberada (URL) durante 0,5 s/pocillo y se transfirió frente a la concentración de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido o no dirigido a FAP sometidas a prueba. Los resultados de las construcciones del ejemplo 2 se muestran en la **figura 20**.

6.3 Ensayo basado en linfocitos T CD8+ específicos de antígeno

Aislamiento y cultivo de linfocitos T CD8 específicos de antígeno

Se obtuvo sangre fresca de un voluntario infectado con CMV HLA-A2+. Se aislaron PBMC como se describe anteriormente. Los linfocitos T CD8 se purificaron a partir de PBMC usando un kit de aislamiento de linfocitos T CD8 humanos de selección negativa de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-094-156). Se resuspendieron diez millones de linfocitos T CD8 aislados en 1 mL de DPBS estéril suplementado con FBS al 1 % (v/v) junto con 50 µL de pentámero HLA-A2 marcado con PE que contenía el péptido NLVPMVATV derivado de CMV (ProImmune, n.º de cat. F008-2B) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con 3 mL de DPBS estéril suministrado con FBS al 1 % (v/v). Las células se resuspendieron en 1 mL de células DPBS suministradas con FBS al 1 % (v/v) que contiene 1 µg/mL de anti-CD8-FITC humano (clon LT8, Abcam, n.º de cat. Ab28010) y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces, se resuspendieron a una concentración de 5 x 10^6 células/mL en DPBS suministrado con FBS al 1 % (v/v), y se filtraron a través de un tamiz celular de red de nailon de separación previa de 30 µm (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130- 041-407). Se aislaron linfocitos T CD8+ específicos del péptido NLV mediante clasificación de FACS usando un clasificador de células ARIA (BD Bioscience con software DIVA) con las siguientes configuraciones: boquilla de 100 µm y mascarilla de clasificación de pureza. Las células clasificadas se recogieron en un tubo de centrífuga de polipropileno de 15 ml (TPP, n.º de cat. 91015) que contenía 5 ml de medio RPMI 1640 suministrado con FBS al 10 % (v/v), GlutaMAX-I al 1 % (v/v) y 400 U/mL de proleucina. Las células clasificadas se centrifugaron durante 7 minutos a 350 x g a temperatura ambiente y se resuspendieron en el mismo medio hasta una concentración de 0,53 x 10^6 células/mL. Se añadieron 100 µL/pocillo de esta suspensión celular a cada pocillo de una placa de alimentación preparada previamente.

Se prepararon células alimentadoras alogénicas irradiadas activadas con PHA-L a partir de PBMC como se describe previamente (Levitsky et al., 1998) y se distribuyeron en placas de cultivo de 96 pocillos a razón de 2 x 10^5 células alimentadoras por pocillo.

Después de un día de cultivo, se retiraron 100 µL de medio/pocillo del pocillo que contenía linfocitos T CD8+ clasificados y se reemplazaron por un nuevo medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10 % (v/v) y GlutaMAX-I al 1 % (v/v) y 400 U/mL de proleucina. Esto se repitió durante el cultivo de forma regular (cada 2-4 días). Tan pronto como las células comenzaron a proliferar, se transfirieron a una placa de cultivo tisular de fondo plano de 24 pocillos (TPP, 92024). Las células se expandieron/dividieron y se reactivaron con una nueva preparación de células alimentadoras de forma regular.

Ensayo de activación de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno

Las células MV3 se recolectaron y se lavaron con DPBS y 2 x 10^7 células se resuspendieron en 250 µL de C diluyente del kit de conector celular de fluorescencia rojo PKH-26 (Sigma, n.º de cat. PKH26GL). Se diluyó 1 µL de solución de tinción roja PKH26 con 250 µL de diluyente C y se añadió a la suspensión de células MV3 que a continuación se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. A esto le siguió la adición de 0,5 mL de FBS y las células se incubaron durante 1 minuto y se lavaron una vez con medio de linfocitos T que consistía en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10 % (v/v), GlutaMAX-I al 1 % (v/v), piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales de MEM al 1 % (v/v) y 50 µm de β-mercaptoetanol. 1 x 10^6 de células MV3 células/mL se resuspendieron en medio de linfocitos T y se separaron en tres tubos. Se añadió péptido sintético NLVPMVATV (obtenido a partir de thinkpeptides) a una concentración final de 1 x 10^{-9} M o 1 x 10^{-8} M y las células

se incubaron durante 90 minutos. Las células MV3 se lavaron una vez con medio de linfocitos T y se resuspendieron a una densidad de 0,5 x 10^6 células/mL, se distribuyeron (100 µL/pocillo) en una placa de suspensión celular de fondo redondo de 96 pocillos (Greiner bio-one, cellstar, n.º de cat. 650185) y se incubaron durante la noche a 37 °C y CO_2 al 5 %. El principio de este ensayo se muestra en la figura 21.

Al día siguiente, se añadieron 50 µL/pocillo de medio de linfocitos T que contenía diferentes concentraciones tituladas de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido. Se recogieron linfocitos T CD8 específicos de NLV, se añadió CFDA-SE (5(6)-carboxifluoresceindiacetato-N-succinimidiléster, SIGMA-Aldrich, n.º de cat. 21888-25MG-F) hasta una concentración final de 40 nM y las células se incubaron en rotación durante 15 minutos a 37 °C. Se detuvo el marcado añadiendo FBS, las células se lavaron y se resuspendieron en medio de linfocitos T a una concentración final de 0,125 x 10^6 células/mL. Se añadieron 50 µL de esta suspensión de linfocitos T CD8 marcados con CFSE a cada pocillo (proporción final E:T = 1:8). Las placas celulares se incubaron durante 24 horas, se retiraron 50 µL/pocillo y se añadieron 50 µL de medio de linfocitos T que contiene 2,64 µL/mL de parada de Golgi (inhibidor del transporte de proteínas que contiene monesina, BD Bioscience, n.º de cat. 554724) (concentración final 0,66 µL/mL). Las células se incubaron durante 4 horas y a continuación las placas se lavaron con 200 µL/pocillo de DPBS y se tiñeron con 100 µL/pocillo de DPBS a 4 °C que contenía tinte de viabilidad fijable eF450 diluido en 1:5000 (eBioscience, n.º de cat. 65-0864) durante 30 minutos a 4 °C. Las placas celulares se lavaron con 200 µL/pocillo de DPBS seguido de tinción con anticuerpos conjugados con colorante fluorescente: anti-CD137-PerCP/Cy5,5 humano (clon 4B4-1, IgG1κ de ratón, BioLegend, n.º de cat. 309814), anti-CD8-BV605 humano (clon RPA-T8, IgG1κ de ratón, BioLegend, n.º de cat. 301012) o 0,67 µg/mL de CD8a -APC/Cy7 antihumano (clon RPA-T8, IgG1κ de ratón, BioLegend, n.º de cat. 301016) y CD25 PE/Cy7 antihumano (clon BC96, IgG1κ de ratón, BioLegend, n.º de cat. 302612). Después de la incubación durante 30 minutos a 4 °C, las células se lavaron dos veces con 200 µL/pocillo de tampón de FACS, se resuspendieron en 50 µL/pocillo de tampón FoxP3 fijo/permanente recién preparado (eBioscience, n.º de cat. 00-5123 y 00-5223) y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Las placas se lavaron dos veces con 200 µL/pocillo de tampón permanente (DPBS suministrado con FBS al 2 % (v/v), saponina al 1 % (p/v) (Sigma Life Science, S7900) y azida sódica al 1 % (p/v) (Sigma-Aldrich, S2002) y se tiñieron con 50 µL/pocillo de tampón permanente (eBioscience, n.º de cat. 00-8333-56) que contiene 0,25 µg/mL de anti-IFNγ-APC humano (clon B27, IgG1κ de rata, BioLegend, n.º de cat. 506510) o 0,33 µg/mL de anti-IFNγ-BV510 humano (clon 4S.B3, IgG1κ de ratón, BioLegend, n.º de cat. 502543). Las placas se incubaron durante 1 hora a 4 °C y se lavaron dos veces con 200 µL/pocillo de tampón permanente. Para la fijación, se añadieron 50 µL/pocillo de DPBS que contenía formaldehído al 1 %. El mismo día o al día siguiente las células se resuspendieron en 100 µL/pocillo de tampón de FACS y se adquirieron usando un citómetro de flujo Fortessa de 5 láseres (BD Bioscience con software DIVA) o Miltenyi Quant Analyzer 10 de 3 láseres (Mitenyi Biotec) y Flow Jo (FlowJo X 10.0.7).

Como se muestra en las figuras 22 y 23 para las construcciones 1.1 a 1.10 y en las figuras 24 y 25 para las construcciones 2.1, 2.3 y 2.4, los linfocitos T CD8+ específicos de antígeno, pero no los controles no estimulados, presentaron mayores niveles de expresión de 4-1BB superficial en presencia de la molécula de unión a antígeno de fusión Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP (trímero 4-1BBL dividido de FAP). Este efecto de 4-1BBL dependía de la dosis y requería que se hiciera el direccionamiento de FAP ya que la adición de la molécula de control no dirigida no afectó el nivel de expresión de 4-1BB. Además, los linfocitos T activadas a la concentración de péptido más alta (1 x 10^{-8} M) mostraron secreción sostenida de INFγ en presencia de la molécula de unión a antígeno de fusión Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a FAP (trímero 4-1BBL dividido de FAP). Conjuntamente, estos datos demuestran que la molécula de unión a antígeno de fusión Fc que contiene un trímero de ligando 4-1BB dirigido a antígeno modula el fenotipo superficial y la capacidad de respuesta de los linfocitos T específicas de antígeno de una manera dependiente del direccionamiento.

6.4 Comparación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc de 4-1BBL Fc de ratón dirigido y no dirigido a la célula

Se prepararon moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB de ratón dirigido y no dirigido (trímero 4-1BBL de ratón dividido de FAP y trímero 4-1BBL de ratón dividido de DP47) como se describe en el ejemplo 1.3.

Para comparar la bioactividad de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB de ratón dirigido y no dirigido a la célula, el tinte de proliferación marcado con eFlour670 (eBioscience, n.º de catálogo 65-0840-90) o el tinte de proliferación celular violeta marcado con CellTrace (Cell tracer, n.º de cat. C34557) se cocultivaron esplenocitos de ratón frescos durante 3-4 días en placas de fondo en U de cultivo tisular de 96 pocillos (TTP, n.º de cat. 92097) con células del clon 39 de NIH/3T3-huFAP irradiadas con 50 Gy de adhesión (para generación véase 5.3) en medio RPMI 1640 (Gibco, n.º de cat. 42401-042) suministrados con FBS al 10 % (v/v), GlutaMAX-I al 1 % (v/v), piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales de MEM al 1 % (v/v) y se añadió 50 µm de β -mercaptoetanolina, la presencia de 0,5 µg/mL de IgG de hámster sirio anti-CD3 de ratón (clon 145-2C11, BD, n.º de cat. 553057) y la molécula candidata al fármaco indicado en un intervalo de concentraciones (figura 26). Después de tres o cuatro días, las células se lavaron con tampón de FACS y se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C en 25 uL de tampón de FACS/pocillo que contenía IgG2a-BV711de rata de anti-CD8 de

ratón (BioLegend, n.º de cat. 100747, clon 53-6.7,) y IgG2a-BV421 de rata de anti-CD4 de ratón (BioLegend, n.º de cat. 100544, clon RM4-5) y 0,67 µg/mL de IgG-PE de hámster sirio (4-1BB) de anti-CD137 de ratón (BioLegend, n.º de cat. 106106, clon 17B5) y IgG2b de rata de anti-CD25-PErCP-Cy5,5 de ratón (BioLegend, n.º de cat. 1019112). Las células se lavaron y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón fijo/permanente preparado (Foxp3/conjunto de tampón de tinción de factor de transcripción, eBioscience, n.º de cat. 00-5523-00). Las células se lavaron dos veces con tampón permanente recién preparado y se tiñeron conjuntamente con 25 µL/pocillo de tampón permanente que contenía anticuerpos marcados con fluorescencia frente al factor de transcripción de linaje citotóxico Eomes, es decir, Eomes anti-ratIgG2a-AlexaFluor488 de ratón (eBioscience, n.º de cat. 534875, clon Dan11mag) y, si CD137 no se tiñó, frente a la molécula efectora citotóxica granzima B, es decir, granzima B de IgG2a de rata-PE (eBioscience, n.º de cat. 128822, clon 16G6) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en tampón de FACS y se adquirieron usando un citómetro de flujo láser Fortessa (BD Bioscience con software DIVA) o el MACSQuant Analyzer 10 de 3 láseres (Miltenyi Biotech) y Flow Jo v10.0.7 (FlowJo LLC). Se establecieron puertas en linfocitos T CD8+ vivos y linfocitos T CD4+ y se determinó la frecuencia de proliferación celular, así como los niveles de expresión de CD25, Eomas y la granzima B o CD137. La frecuencia de proliferación y las frecuencias y MFI de los marcadores de activación se transfirieron frente a la concentración de moléculas de fusión (kih) de Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB de ratón usadas para mostrar la actividad funcional. Como se puede observar en la figura 27, se pudo observar un aumento en la proliferación de linfocitos T CD8+ para las construcciones M.1 y M.2.

6.5 Cambios en el hígado en ratones tratados con anticuerpo anti-murino 4-1BB Lob 12.3 (muIgG1 Wt) o con la construcción M.2

Se trataron ratones C57BL/6 portadores de MC38-muFAP (modelo de cáncer colorrectal murino) s.c. una vez por semana durante 3 semanas con anticuerpos agonistas anti-murinos 4-1BB dirigidos a FAP (Estudio de eficacia 020-GA1401: "Experimento para demostrar la eficacia del tratamiento dirigido a 4-1BB en combinación con a-PD-L1 en el modelo MC38-muFAP s.c. en ratones C57B6"). Los anticuerpos usados fueron Lob 12.3 muIgG1 Wt (con Fc "natural", clon Lob 12.3 de BioXcell # de catálogo: BE0169) o la construcción M.2 con mutación de DAPG (Fc inactivo). Los dos anticuerpos se administraron una vez a la semana durante tres semanas consecutivas. Se sacrificaron cuatro animales/grupo 7 días después del último tratamiento y se examinaron microscópicamente los hígados.

Se observaron cambios hepáticos solo en animales que recibieron Lob 12.3 muIgG1 Wt, que consiste en focos de degeneración hepatocelular con acumulación de macrófagos positivos para F4/80 y una menor cantidad de población mixta de células inflamatorias (principalmente linfocitos) que muestran frecuentemente una distribución vasocéntrica. Ocasionalmente se observó necrosis unicelular de hepatocitos e infiltrados de células mononucleares perivasculares en los espacios de acceso. No se observaron hallazgos relacionados con el tratamiento en el hígado de los animales que recibieron la construcción M.2 (tabla 41).

Tabla 41: Incidencia de hallazgos histopatológicos (n = 4/grupo)

Tratamiento	Vehículo	Lob 12.3 muIgG1 Wt	Construcción M.2
Focos de degeneración hepatocelular con macrófagos y células inflamatorias	-	4	-
Infiltrados de células inflamatorias perivasculares	-	4	-
Necrosis de células individuales	-	4	-

Se ha observado hepatitis, atribuida a la reticulación por FcγR en el hígado, en pacientes tratados con Urelumab BMS-663513 (Ascierto PA et al. 2010) y en ratones que usan el sustituto de ratón. La ausencia de hallazgos hepáticos en animales tratados con un anticuerpo con Fc inactivo apoya esta hipótesis.

6.6 Determinación de los parámetros farmacocinéticos de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB humano

Con el fin de probar si las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB humano de la invención son adecuadas para uso farmacéutico, se determinaron los parámetros farmacocinéticos (datos de PK) tales como el aclaramiento, el volumen de distribución o el tiempo medio de eliminación ($t_{1/2}$) en ratones. Por tanto, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

Experimento A: PK de dosis única de la construcción 1.2 y el control B en ratones NOG sanos

Ratones hembra NOG de una edad promedio de 8 a 10 semanas al inicio del experimento (adquiridos de Taconic, instalación SOPF) 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). El protocolo del estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local (P 2011128). Después de su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para acostumbrarse al nuevo entorno y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento de salud continuo regularmente.

Se realizó un estudio farmacocinético de dosis única (SDPK) para evaluar la exposición de la construcción 1.2 y el control B. Se administró un bolo por vía intravenosa de 2,5 mg/kg a ratones NOG y se obtuvieron muestras de sangre en los puntos temporales seleccionados para la evaluación farmacocinética. Las muestras de suero de ratón se analizaron mediante ELISA. Se añadieron gradualmente 4-1BB humano biotinilado, muestras de prueba, anticuerpo anti-huCH1 marcado con digoxigenina y anticuerpo de detección anti-digoxigenina (POD) a una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina de 96 pocillos y se incubaron después de cada etapa durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces después de cada etapa para eliminar las sustancias no unidas. Finalmente, el complejo unido a peroxidasa se visualizó añadiendo solución de sustrato ABTS para formar un producto de reacción coloreado. La intensidad del producto de reacción que se determinó fotométricamente a 405 nm (con una longitud de onda de referencia a 490 nm) es proporcional a la concentración de analito en la muestra de suero. El intervalo de calibración de la curva estándar para las construcciones fue de 0,156 a 10 ng/ml, donde 3 ng/ml es el límite inferior de cuantificación (LLOQ). La figura 28A muestra la disminución de la concentración a lo largo del tiempo como se observa en este experimento.

Experimento B: PK de dosis única de las construcciones 2.1, 2.3, del control B y del control C en ratones NOG que portan tumores humanizados con células madre

Se realizó un estudio farmacocinético de dosis única (SDPK) para evaluar la exposición de las construcciones 2.1, 2.3, el control B y el control C. Jackson Laboratories suministró ratones hembra NSG transferidos con células madre humanas. Los ratones 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). El protocolo del estudio experimental fue revisado y aprobado por el gobierno local (ZH193-2014). Después de su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para acostumbrarse al nuevo entorno y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento de salud continuo regularmente.

Se obtuvieron originalmente las células MKN45 humanas (carcinoma gástrico humano) de ATCC y después de su expansión se depositaron en el banco celular interno Glycart. Las células se cultivaron en DMEM que contenía FCS al 10 %. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO_2 al 5 %. El paso 9 in vitro se usó para inyección subcutánea, con una viabilidad de un 97 %. Los fibroblastos humanos NIH-3T3 se diseñaron en Roche Nutley para expresar FAP humana. El clon 39 se usó en un paso in vitro número 12 y con una viabilidad del 98 %. Se inyectaron 50 microlitros de suspensión celular (1 x 106 células MKN45 + 1 x 106 3T3-huFAP) mezclada con 50 microlitros de Matrigel por vía subcutánea en el costado de ratones anestesiados. Se administró una inyección intravenosa rápida de 10 mg/kg a ratones humanizados cuando el tumor alcanzó un tamaño medio de 190 mm^3. Se tomaron muestras de sangre en momentos seleccionados para la evaluación farmacocinética. Las muestras de suero de ratón se analizaron mediante ELISA. Se añadieron gradualmente 4-1BB humano biotinilado, muestras de prueba, anticuerpo anti-huCH1 marcado con digoxigenina y anticuerpo de detección anti-digoxigenina (POD) a una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina de 96 pocillos y se incubaron después de cada etapa durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces después de cada etapa para eliminar las sustancias no unidas. Finalmente, el complejo unido a peroxidasa se visualiza añadiendo solución de sustrato ABTS para formar un producto de reacción coloreado. La intensidad del producto de reacción que se determinó fotométricamente a 405 nm (con una longitud de onda de referencia a 490 nm) es proporcional a la concentración de analito en la muestra de suero. El intervalo de calibración de la curva estándar para las construcciones fue de 0,156 a 10 ng/ml, donde 3 ng/ml es el límite inferior de cuantificación (LLOQ). La figura 28B muestra la disminución de la concentración de la construcción a lo largo del tiempo como se observa en este experimento.

Experimento C: PK de dosis única de la construcción 2.1 y 2.3 en ratones NOG sanos

Ratones hembra NOG de una edad promedio de 8 a 10 semanas al inicio del experimento (adquiridos de Taconic, instalación SOPF) 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). El protocolo del estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local (P 2011128). Después de su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para acostumbrarse al nuevo entorno y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento de salud continuo regularmente.

Se realizó un estudio farmacocinético de dosis única (SDPK) para evaluar la exposición de las construcciones 2.1 y 2.3. Se administró una administración intravenosa rápida i.v. de 2,5 mg/kg a ratones NOG y se obtuvieron muestras de sangre en los puntos temporales seleccionados para la evaluación farmacocinética. Las muestras de suero de ratón se analizaron mediante ELISA. Se añadieron gradualmente 4-1BB humano biotinilado, muestras de prueba, anticuerpo anti-huCH1 marcado con digoxigenina y anticuerpo de detección anti-digoxigenina (POD) a una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina de 96 pocillos y se incubaron después de cada etapa durante

1 hora a temperatura ambiente. La placa se lava tres veces después de cada etapa para eliminar las sustancias no unidas. Finalmente, el complejo unido a peroxidasa se visualiza añadiendo solución de sustrato ABTS para formar un producto de reacción coloreado. La intensidad del producto de reacción que se determina fotométricamente a 405 nm (con una longitud de onda de referencia a 490 nm) es proporcional a la concentración de analito en la muestra de suero. El intervalo de calibración de la curva estándar para las construcciones fue de 0,156 a 10 ng/ml, donde 3 ng/ml es el límite inferior de cuantificación (LLOQ). La figura 28C muestra la disminución observada en la concentración a lo largo del tiempo.

Las construcciones sometidas a prueba 2.1 y 2.3 son lo suficientemente estables en el cuerpo y poseen parámetros PK en un intervalo adecuado para el desarrollo farmacéutico. También se puede concluir a partir de los resultados que la construcción 2.1 es ligeramente más estable.

6.7 Prevalencia de FAP en tumores humanos

La prevalencia de FAP en tumores humanos se evaluó como se describe en el documento WO 2014/161845 para comprender el posible uso clínico de las construcciones dirigidas a FAP.

Se usó anticuerpo de rata anti-seprasa humana (IgG2a, clon D8) de Vitatex (MABS1001) para inmunoteñir secciones de FFPET de 2,5 µm a partir de diversas indicaciones tumorales en el Ventana Benchmark XT. Las secciones se sometieron a un tratamiento estándar CC1 seguido de incubación de anticuerpos durante 60 segundos a 37 °C a una concentración de 5 µg/mL en diluyente de anticuerpos Dako (S3022) y se detectó tinción positiva usando el sistema de detección de DAB Ultraview (Ventana # 760-4456). Se usó como control negativo el anticuerpo de isotipo emparejado de Abeam (ab 18450). El infiltrado estromal FAP+ estuvo presente en tumores humanos de diferentes indicaciones que incluyen carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de mama, cáncer colorrectal (CRC), cáncer de páncreas (PAC), cáncer gástrico, carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC) y mesotelioma que marca indicaciones clínicas potencialmente interesantes para construcciones dirigidas a FAP (tabla 42).

Tabla 42: Prevalencia de FAP en tumores humanos

Tipo de tumor	% de casos con grado moderado a alto de infiltrado de FAP^+	N.º de muestras investigadas
HNSCC	90	10
Cáncer de mama	77	105
BC triple negativo	80	7
CRC	77	90
PAC	74	19
Cáncer gástrico	68	28
NSCLC	66	90
Mesotelioma	60	10

Ejemplo 7

7.1 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido a CD19 (8B8-018)

7.1.1 Preparación, purificación y caracterización de la fusión Fc del antígeno CD19 para la campaña de presentación de fagos

Para expresar y purificar el ectodominio CD19 humano y de macaco cangrejero en un estado monomérico (CD19 humano, véase SEQ ID NO: 31), el fragmento de ADN respectivo se fusionó con un segmento del gen Fc de IgG1 humana que contenía las mutaciones de "botón" (humano: SEQ ID NO: 186; macaco cangrejero: SEQ ID NO: 188) y se transfectó con un homólogo de "ojal Fc" (SEQ ID NO: 86) (Merchant et al., 1998). Se introdujo un sitio de escisión de IgA (PTPPTP) entre un ectodominio de antígeno y la cadena de botón Fc. Se introdujo una marca Avi para la biotinilación dirigida en el extremo C de la cadena de botón antígeno-Fc y se introdujeron las mutaciones H435R e Y436F en el ojal Fc con propósitos de purificación (Jendeberg L. et al, J. Immunological methods, 1997). La combinación de la cadena de botón antígeno-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W (humano: SEQ ID NO: 187; macaco cangrejero: SEQ ID NO: 189), con una cadena de ojal Fc que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V (SEQ ID NO: 90) permite la generación de un fragmento de fusión Fc heterodimérico que incluye una única copia del ectodominio CD19 (similar a la construcción de 4-1BB en la figura 5C). La Tabla 43 enumera las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la construcción de fusión Fc de antígeno.

Tabla 43: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de fusión (kih) de Fc antígeno CD19 humano y de macaco cangrejero monomérico

SEQ ID NO:	Antígeno	Secuencia
86	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc	véase la tabla 32
186	Secuencia de nucleótidos, antígeno CD19 humano cadena de botón Fc marca avi	CCCGAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGGCGACAAT GCCGTGCTGCAGTGCCTGAAGGGCACCTCCGATGGCCCTACC CAGCAGCTGACCTGGTCCAGAGAGAGCCCCCTGAAGCCCTTC CTGAAGCTGTCTCTGGGCCTGCCTGGCCTGGGCATCCATATG AGGCCTCTGGCCATCTGGCTGTTCATCTTCAACGTGTCCCAG CAGATGGGCGGCTTCTACCTGTGTCAGCCTGGCCCCCCATCT GAGAAGGCTTGGCAGCCTGGCTGGACCGTGAACGTGGAAGGA TCCGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACGTGTCCGATCTGGGCGGC CTGGGATGCGGCCTGAAGAACAGATCTAGCGAGGGCCCCAGC AGCCCCAGCGGCAAACTGATGAGCCCCAAGCTGTACGTGTGG GCCAAGGACAGACCCGAGATCTGGGAGGGCGAGCCTCCTTGC CTGCCCCCTAGAGACAGCCTGAACCAGAGCCTGAGCCAGGAC CTGACAATGGCCCCTGGCAGCACACTGTGGCTGAGCTGTGGC GTGCCACCCGACTCTGTGTCTAGAGGCCCTCTGAGCTGGACC CACGTGCACCCTAAGGGCCCTAAGAGCCTGCTGAGCCTGGAA CTGAAGGACGACAGGCCCGCCAGAGATATGTGGGTCATGGAA ACCGGCCTGCTGCTGCCTAGAGCCACAGCCCAGGATGCCGGC AAGTACTACTGCCACAGAGGCAACCTGACCATGAGCTTCCAC CTGGAAATCACCGCCAGACCCGTGCTGTGGCACTGGCTGCTG AGAACAGGCGGCTGGAAGGTCGACGCTAGCGGTGGTAGTCCG ACACCTCCGACACCCGGGGGTGGTTCTGCAGACAAAACTCAC ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCAGGGGGACCG TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCGGAGCCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCC GGAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGG CACGAG
90	Secuencia de polipéptidos, cadena de ojal Fc	véase la tabla 32

187	Secuencia de polipéptidos, antígeno CD19 humano cadena de botón Fc marca avi	PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPF LKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPS EKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPS SPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNQSLSQD LTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLE LKDDRPARDMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFH LEITARPVLWHWLLRTGGWKVDASGGSPTPPTPGGGSADKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
188	Secuencia de nucleótidos, antígeno CD19 de macaco cangrejero	CCCCAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGGCGACAAT GCCGTGCTCCAGTGCCTGGAAGGCACCTCCGATGGCCCTACA CAGCAGCTCGTGTGGTGCAGAGACAGCCCCTTCGAGCCCTTC CTGAACCTGTCTCTGGGCCTGCCTGGCATGGGCATCAGAATG GGCCCTCTGGGCATCTGGCTGCTGATCTTCAACGTGTCCAAC CAGACCGGCGGCTTCTACCTGTGTCAGCCTGGCCTGCCAAGC

	Marca avi de cadena de botón Fc	GAGAAGGCTTGGCAGCCTGGATGGACCGTGTCCGTGGAAGGA TCTGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACGTGTCCGATCTGGGCGGC CTGGGATGCGGCCTGAAGAACAGAAGCAGCGAGGGCCCTAGC AGCCCCAGCGGCAAGCTGAATAGCAGCCAGCTGTACGTGTGG GCCAAGGACAGACCCGAGATGTGGGAGGGCGAGCCTGTGTGT GGCCCCCCTAGAGATAGCCTGAACCAGAGCCTGAGCCAGGAC CTGACAATGGCCCCTGGCAGCACACTGTGGCTGAGCTGTGGC GTGCCACCCGACTCTGTGTCCAGAGGCCCTCTGAGCTGGACA CACGTGCGGCCAAAGGGCCCTAAGAGCAGCCTGCTGAGCCTG GAACTGAAGGACGACCGGCCCGACCGGGATATGTGGGTGGTG GATACAGGCCTGCTGCTGACCAGAGCCACAGCCCAGGATGCC GGCAAGTACTACTGCCACAGAGGCAACTGGACCAAGAGCTTT TACCTGGAAATCACCGCCAGACCCGCCCTGTGGCACTGGCTG CTGAGAATCGGAGGCTGGAAGGTCGACGCTAGCGGTGGTAGT CCGACACCTCCGACACCCGGGGGTGGTTCTGCAGACAAAACT CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCAGGGGGA CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC AGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA TCCGGAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAA TGGCACGAG
189	Secuencia de polipéptidos, antígeno CD19 de macaco cangrejero cadena de botón Fc marca avi	PQEPLVVKVEEGDNAVLQCLEGTSDGPTQQLVWCRDSPFEPF LNLSLGLPGMGIRMGPLGIWLLIFNVSNQTGGFYLCQPGLPS EKAWQPGWTVSVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPS SPSGKLNSSQLYVWAKDRPEMWEGEPVCGPPRDSLNQSLSQD LTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVRPKGPKSSLLSL ELKDDRPDRDMWVVDTGLLLTRATAQDAGKYYCHRGNWTKSF YLEITARPALWHWLLRIGGWKVDASGGSPTPPTPGGGSADKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE

Para la producción de las moléculas de fusión antígeno monomérico/Fc, se cotransfectaron células CHO en suspensión de crecimiento exponencial con dos plásmidos que codifican los dos componentes de la proteína de fusión (cadenas de botón y ojal) usando procedimientos estándar.

La proteína secretada se purificó de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A, seguido de una cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, se

cargó el sobrenadante en una columna MabSelect Sure de volumen (CV)= 5-15 mL, resina de GE Healthcare, equilibrado con fosfato de sodio (20 mM), citrato de sodio (20 mM), tampón de cloruro de sodio 0,5 M (pH 7,5). La proteína no unida se eliminó lavando con al menos 6 volúmenes de columna del mismo tampón. La proteína unida se eluyó usando un gradiente lineal; etapa 1, 10 CV de tampón de elución del 0 al 60 % (citrato de sodio 20 mM, tampón de cloruro de sodio 500 mM (pH2,5)); etapa 2, 2 CV de tampón de elución del 60 al 100 %. Para el gradiente lineal, se aplicó una etapa de elución adicional de 2 volúmenes de columna con tampón de elución al 100 %.

El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/40 (v/v) de Tris 2 M, pH 8,0. La proteína se concentró y se filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con MOPS2 mM, cloruro de sodio 150 mM, solución de azida sódica al 0,02 % (p/v) de pH 7,4.

La tabla 44 resume el rendimiento y el contenido de monómero final de la proteína de fusión (kih) de Fc antígeno CD19 humano y de macaco cangrejero monomérico.

Tabla 44: Análisis bioquímico de la de proteína de fusión (kih) de Fc antígeno CD19 humano y de macaco cangrejero monomérico

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
proteína de fusión (kih) de Fc CD19 humano monomérico	91	0,2
proteína de fusión (kih) de Fc CD19 de macaco cangrejero monomérico	95	3,56

Parte del antígeno purificado se biotiniló in vitro usando el kit de reacción estándar de biotina-proteína ligasa BirA (Avidity, # de cat. BirA500) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El grado de biotinilación para la fusión que contiene CD19 humano fue del 94 %, para la construcción de CD19 de macaco cangrejero respectiva del 100 %. La proteína biotinilada se usó a continuación para la selección, cribado y caracterización de clones derivados de 8B8 madurados por afinidad desprovistos de los puntos calientes de desamidación N27d y N28.

7.1.2 Generación del clon anti-CD19 8B8-018

7.1.2.1 Inmunización y generación de anticuerpos de ratón anti-CD19 humano (hibridomas)

Se inmunizó seis veces a ratones Balb/c y se aplicó una dosis de refuerzo con células HEK293 transfectadas con CD19 (densidad media de receptores 35.000 por célula). Se controló la respuesta inmunitaria analizando muestras de suero con un ELISA en células de CD19 en células NIH-3T3 transfectadas con CD19 humano. Se usaron células esplénicas de ratones con valores suficientes de anticuerpo anti-CD19 humano para su inmortalización por fusión con la línea celular de mieloma de ratón P3X63 Ag8.653. Se llevaron a cabo tres fusiones y se cribaron los sobrenadantes de hibridoma mediante ELISA en células NIH-3T3 transfectadas con CD19 humano y ensayo de unión por FACS usando células Daudi (CD19+) y CD19- para determinar los anticuerpos específicos anti-CD19 humano (véase el example 1 del documento WO 2011/147834).

7.1.2.2 Cribado de hibridomas y evaluación funcional biológica celular del anticuerpo anti-CD19

<u>ELISA en células para el cribado de anticuerpos frente al CD19 humano</u>

Se aplicó un ELISA en células para el cribado de hibridomas y para identificar aquellos hibridomas que segregan anticuerpos contra el CD19 humano. Se usaron células NIH3T3 transfectadas con CD19 humano como células positivas; se usaron células NIH3T3 no transfectadas como células de control negativo. Para la evaluación de los hibridomas positivos se cuantificó la proporción de DO entre las células NIH3T3 transfectadas y no transfectadas.

- Medio de cultivo: DMEM con alto contenido de glucosa (4,5 mg/ml), SBF al 10 %, piruvato Na, AANE, glutamina.

- Control positivo de anticuerpos: anticuerpo monoclonal anti-CD19 (IgG1) Pharmingen n.º cat. 555409 c = 1 mg/ml

- Anticuerpo de detección: anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H+L) conjugado con HRP Bio-Rad n.º cat. 170-06516.

- Dilución 1:2000 en reactivo de bloqueo ELISA lx

- Otros reactivos: Fibronectina Roche # de cat. 838039 c = 1 mg/ml

- Glutardialdehído: solución madre al 25 % // Grade Agar Scientific # R102 concentración final: 0,05 % en PBS

- Reactivo de bloqueo ELISA: 10x de solución madre // Roche, # de cat. 1112589

- Sustrato TMB: Roche, # de cat. 11432559

- Solución de parada: 1 M H2SO4

- BioRad n.º cat. 170-6516 Dilución 1:2000 en 1x reactivo de bloqueo de ELISA

Día 1:

- Recubrimiento de fibronectina: 5 µg/cm^2 en PBS; placa de 96 pocillos = 32 cm^2; 160 µg/placa en 6 ml.

- PBS, 50 µl/pocillo

- Incubar 45 min a TA, aspirar la solución de recubrimiento.

- Sembrar 1,25 x 104 células/pocillo en 50 µl de medio de cultivo en una placa de 96 pocillos

- Incubar 40 horas a 37 °C.

- Agregar a la mitad superior de la placa: células NIH3T3 que expresan CD19.

- Agregar a la mitad inferior de la placa: células NIH3T3 no transfectadas.

Día 3:

- Adición de anticuerpo de control positivo o muestras (sobrenadante o suero de ratón) en 50 µl de medio de cultivo.

- Incubar durante 2 h a 4 °C.

- Eliminar el medio, fijar las células con 100 µl de glutardialdehído (0,05 % en PBS).

- Lavar dos veces con 200 µl de PBS.

- Adición del anticuerpo de detección 1:2000, 50 µl/pocillo.

- Incubar 2 h a TA.

- Lavar tres veces con 200 µl de PBS.

- Agregar 50 µl de TMB, incubar durante 30 min a TA,

- parar mediante la adición de 25 µl de H2SO4 1 M; leer la extinción a 450 nm/620 nm

- Cálculo de resultados: proporción de DO NIH3T3 CD19: DO NIH3T3 no transfectadas.

El anticuerpo seleccionado demostró unión específica a células NIH3T3 transfectadas con CD19 en comparación con células NIH3T3 no transfectadas (véase el ejemplo 2 del documento WO 2011/147834).

7.1.2.3 Humanización del anticuerpo anti-CD19

La especificidad de unión a CD19 del anticuerpo murino se transfirió a una región estructural aceptora humana para eliminar potenciales problemas de inmunogenicidad debidos a tramos de secuencia que el cuerpo humano reconocerá como exógenos. Esto se realizó injertando todas las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo murino (donante) en un región estructural del anticuerpo humano (aceptor), y se denomina injerto de CDR o humanización de anticuerpos.

La secuencia de aminoácidos murina se alineó con una colección de genes V de anticuerpos de la línea germinal humana, y se clasificó de acuerdo con la identidad de secuencia y la homología. Antes de seleccionar una secuencia aceptora concreta, se deben determinar las llamadas estructuras clásicas de bucle del anticuerpo donante (Morea, V.,et al., Methods, Vol 20, n.º 3 (2000) 267-279). Estas estructuras clásicas de bucle están determinadas por el tipo de residuos presentes en las llamadas posiciones clásicas. Estas posiciones se

encuentran (parcialmente) fuera de las regiones CDR, y se deben mantener funcionalmente equivalentes en la construcción final para conservar la conformación de las CDR del anticuerpo original (donante). Se eligió la secuencia VBASE_VH1_1 de la línea germinal humana como el aceptor para la cadena pesada y se eligió la secuencia VBASE_VK2_5 para la cadena ligera.

7.1.2.4 Eliminación de puntos calientes de desamidación

Se ha descubierto que el anticuerpo anti-CD19 humano humanizado natural tiene tres puntos calientes de desamidación en el HVR-L1: NSNGNT (SEQ ID NO: 190). Adicionalmente, se ha descubierto que en la HVR-H2 está presente un punto caliente de desamidación adicional: KFNG (SEQ ID NO: 191). Para abordar el punto caliente de desamidación en la HVR-H2, se ha introducido una mutación puntual de N (Asn) a Q (Gln) en la posición 64 (numeración de acuerdo con Kabat). Por tanto, el anticuerpo como se informa en el presente documento tiene una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos TEKFQGRVTM (SEQ ID NO: 192).

Para abordar los puntos calientes de desamidación en la cadena ligera y obtener un anticuerpo anti-CD19 humano humanizado con una estabilidad de desamidación mejorada, se introdujeron mutaciones individuales en las posiciones 27d, 27e, 28 y 29 de Kabat y una doble mutación en las posiciones 27e y 28 (numeración de acuerdo con Kabat). En total se han generado 9 variantes (var. 1 a var. 9) del anticuerpo humanizado natural (var. 0) (véase la tabla 45).

Tabla 45: Variantes del anticuerpo CD19 natural humanizado

Kabat posición LC:	2222 7789 de	Kabat posición HC:	6 4
var.0:wt	QSLENSNGNTYLNW		TEKFNGKATM
var.1:N27dH	QSLE**H**SNGNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.2:N27dQ	QSLE**Q**SNGNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.3:S27eA	QSLEN**A**NGNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.4:S27eV	QSLEN**V**NGNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.5:S27eP	QSLEN**P**NGNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.6:N28Q	QSLENS**Q**GNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.7:G29A	QSLENSN**A**NTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.8:G29V	QSLENSN**V**NTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.9:S27eP/N28S	QSLEN**PS**GNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM

variante→	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
↓ parámetro										
K_D (BIAcore) [nM]	5	250	136	2	1	6	54	4	16	45
$t_{1/2}$ [min]	-	0,1	1,1	105,2	191,5	43,6	4,4	51,5	17,6	4
unión a CD19 humano después de incubación a pH7,4 [%]	46	0	75	84	85	95	91	72	83	83
unión a CD19 humano después de incubación a pH6,0 [%]	90	0	95	95	97	99	97	86	91	87
pico principal por SEC después de la incubación [%]	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	-

Se ha descubierto que con una sola mutación en la posición 27e de acuerdo con Kabat de S (serina) a P (prolina) se pueden resolver todos los puntos calientes de desamidación de la HVR-L1. Esta es una mutación no del residuo de N (asparagina) propenso a la desamidación, sino de un residuo cercano.

Por tanto, el anticuerpo como se informa en el presente documento tiene una HVR-L1 que comprende la secuencia

de aminoácidos LENPNGNT (SEQ ID NO: 193). En un modo de realización, el anticuerpo anti-CD19 humano humanizado comprende una HVR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos LENPSGNT (SEQ ID NO: 194).

Adicionalmente, estos anticuerpos mantienen la reactividad cruzada contra el CD19 de macaco cangrejero como se muestra en la **tabla 46** siguiente.

EC50 [µg/ml]	var.0	var.5	var.9
huCD19 ECD	0.087	0.084	0.089
cyCD19 ECD	0.313	0.255	0.435

El anticuerpo humanizado anti-CD19 humano natural (var.0) muestra después de la purificación aprox. un 7,5 % de desamidación. Después de almacenarlo durante dos semanas a pH7,4, la cantidad de anticuerpo desamidado se incrementa aprox. al 18,5 %. El anticuerpo variante con una mutación S27eP (var.5) muestra aprox. un 2 % de desamidación y un 2 % de formación de succinimida después de la purificación. Durante el almacenamiento a pH7,4 durante dos semanas solo está presente aprox. el 7,5 % de anticuerpo desamidado. La var. 5 se denomina clon 8B8-018 y se eligió para la preparación de moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF dirigido a CD19.

7.1.3 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-254) dirigido a CD19(8B8-018) monovalente con dominios CH1-CL cruzados con residuos cargados (construcción 3.1)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-254), separados por conectores (G4S)2 y fusionado con el dominio de IgG1-CL humano, como se representa en la figura 29A: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CL humano. Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-254) y se fusionó con el dominio IgG1- CH humano, como se representa en la figura 29B: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CH humano.

Se subclonó el polipéptido que codifica el ligando dimérico de 4-1BB fusionado al dominio CL humano sin cambio de pauta de lectura con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant, Zhu et al. 1998). Para mejorar el emparejamiento correcto, se han introducido las siguientes mutaciones en el CH-CL cruzado. En el ligando dimérico 4-1BB fusionado con CL, E123R y Q124K humanos. En el ligando monomérico 4-1BB fusionado con CH1, K147E y K213E humanos.

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**, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido 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.

La combinación de la cadena de botón de ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal Fc anti-CD19 dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y una Fab de unión a CD19 (**figura 30**, construcción 3.1).

La **tabla 47** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) monovalente con CH-CL cruzado y residuos cargados (construcción 3.1).

Tabla 47: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CD19 (8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 3.1). * para residuos cargados

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
129	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
130	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3

203	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAA ACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCG GATACACCTTCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAGGC AGGCCCCTGGCCAAGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTA ACCCATATAATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTC AGGGAAGAGTCACTATGACATCTGACACCAGTATCAGC ACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGAC ACCGCAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCACATATTACTAC GGCTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAACCACA GTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTG TTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG CACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGA CCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTT CTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTT CTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT GGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGC AGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC GTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA
204	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	GACATCGTCATGACCCAGACACCCCTGTCCCTCTCTGTG ACCCCTGGCCAGCCAGCCTCAATTAGCTGCAAGTCCTCT CAAAGTCTGGAGAACCCCAATGGGAACACTTACCTTAAT TGGTATCTGCAGAAACCCGGACAATCCCCTCAACTCCTG ATCTACAGGGTCTCTAAGAGATTCTCAGGCGTGCCAGAT CGCTTTAGCGGTTCCGGGTCTGGCACAGACTTCACCTTG AAGATTAGTCGGGTTGAAGCTGAGGATGTGGGAGTCTA TTACTGTCTGCAGCTCACTCATGTGCCCTACACCTTTGGT CAGGGCACAAAACTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGC TCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCT GAAGTCCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGT GACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGT CCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGC ACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTG TCCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC
115	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
116	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3

205	cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQ APGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
206	cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNTYLNWY LQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

7.1.4 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-254) dirigido a CD19 (8B8-018) monovalente con dominios CH1-CL cruzados sin residuos cargados (construcción 3.2)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-254), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el dominio de IgG1-CL humano, de forma similar a como se representa en la figura (29A), pero sin mutaciones aminoacídicas en el dominio CL: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CL humano. Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-254) y se fusionó con el dominio de IgG1-CH1 humano, de forma similar a como se representa en la figura (29B), pero sin mutaciones aminoacídicas en el dominio CH1: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, 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, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o la cadena ligera constante de IgG1 humana.

Se han introducido 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. La combinación de la cadena de botón ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal Fc anti-CD19 dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y una Fab de unión a CD19 (figura 30, construcción 3.2).

La tabla 48 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL cruzado sin residuos cargados (construcción 3.2).

Tabla 48: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) que contiene cruce de CH-CL sin residuos cargados (construcción 3.2).

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
165	Secuencia de nucleótidos, ligando dimérico (71-254) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 22
166	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1	véase la tabla 22
203	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc	véase la tabla 47

	anti-CD19(8B8-018)	
204	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
117	Ligando dimérico (71-254) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 22
118	Ligando monomérico (71-254) - CH1	véase la tabla 22
205	cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
206	cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47

7.1.5 Preparación de la unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-254) dirigido a CD19(8B8-018) bivalente (construcción 3.3)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-254), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el extremo C de la cadena de ojal Fc de IgG1 humana, como se representa en la figura 29C: ojal Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano. Un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-254) se fusionó con el extremo C de la cadena de botón Fc de IgG1 humana como se describe en la figura 29D: botón Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano.

La región variable de secuencias de ADN de cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para CD19, clon 8B8-018, se subclonó sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal, el botón o la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido 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. La combinación de la cadena del ligando dimérico de ojal anti-CD19 huIgG1 que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena del ligando monomérico de botón anti-CD19 huIgG1 que contiene las mutaciones S354C/T366W y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fab de unión a CD19 (figura 30, construcción 3.3).

La tabla 49 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) bivalente (construcción 3.3).

Tabla 49: Secuencias de pares de bases de fusión PGLALA (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) bivalente (construcción 3.3)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
207	Secuencia de nucleótidos, cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAA ACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCG GATACACCTTCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAGGC AGGCCCCTGGCCAAGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTA ACCCATATAATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTC

		AGGGAAGAGTCACTATGACATCTGACACCAGTATCAGC ACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGAC ACCGCAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCACATATTACTAC GGCTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAACCACA GTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTG TTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG CACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGA CCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTT CTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTT CTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT GGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGC AGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC GTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGA GAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACT GCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGC CCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCG GCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAA CTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGT GTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGC TGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCC TGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCA AGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGG GAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCC TGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTC AGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCA AGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATC TAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCAGCCG GGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCAGCTG GTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGC TGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACT GGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGT GGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCT GGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGAT CTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTG

		CTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGC CACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGG TTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCG CCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGC ATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGA CTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTGCCA AGCCCTAGATCAGAA
208	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-018)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAA ACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCG GATACACCTTCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAGGC AGGCCCCTGGCCAAGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTA ACCCATATAATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTC AGGGAAGAGTCACTATGACATCTGACACCAGTATCAGC ACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGAC ACCGCAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCACATATTACTAC GGCTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAACCACA GTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGA CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT TGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGA GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTG GTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCAC CCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTA CTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGG GCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCC CGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGA GAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACT GCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGC CCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCG GCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAA CTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGT GTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGC TGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCC TGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCA AGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGG

		GAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCC TGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTC AGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCA AGAAGCGAA
204	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
209	cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQ APGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQ GMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKED TKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQL VAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG AAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVH LHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
210	ligando monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQ APGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQ GMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKED TKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSE
206	cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47

7.1.6 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-248) dirigido a CD19(8B8-018) monovalente con dominios CH1-CL cruzados con residuos cargados (construcción 3.4)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-248), separados por conectores (G4S) 2, y fusionados con el dominio IgG1-CL humano, de forma análoga al representado en la figura 29A: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CL humano. Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-248) y se fusionó con el dominio IgG1- CH humano, de forma

análoga al descrito en la figura 29B: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CH humano.

Se subclonó el polipéptido que codifica el ligando dimérico de 4-1BB fusionado al dominio CL humano sin cambio de pauta de lectura con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant, Zhu et al. 1998). Para mejorar el emparejamiento correcto, se han introducido las siguientes mutaciones en el CH-CL cruzado. En el ligando dimérico 4-1BB fusionado con CL, E123R y Q124K humanos. En el ligando monomérico 4-1BB fusionado con CH1, K147E y K213E humanos.

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, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas pesadas de botón y 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 botón ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal Fc anti-CD19 dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y una Fab de unión a CD19 (**figura 30**, contrucción 3.4).

La **tabla 50** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19 (8B8-018) monovalente con CH-CL cruzado y residuos cargados (construcción 3.4).

Tabla 50: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19 (8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 3.4). * residuos cargados

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
169	Secuencia de nucleótidos, ligando dimérico (71-248) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 24
170	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1*	véase la tabla 24
203	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
204	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
119	Ligando dimérico (71-248) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 24
120	Ligando monomérico (71-248) - CH1*	véase la tabla 24
205	cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
206	cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47

7.1.7 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-248) dirigido a CD19 (8B8-018) monovalente con dominios CH1-CL cruzados sin residuos cargados (construcción 3.5)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-248), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el dominio de IgG1-CL humano, de forma similar a como se representa en la figura (29A), pero sin mutaciones aminoacídicas en el dominio CL: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CL humano. Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-248) y se fusionó con el dominio de IgG1-CH1 humano, de forma similar a como se representa en la figura (29B), pero sin mutaciones aminoacídicas en el dominio CH1: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, 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, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido 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. La combinación de la cadena de botón ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal Fc anti-CD19 dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y una Fab de unión a CD19 (figura 30, construcción 3.5).

La **tabla 51** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL cruzado sin residuos cargados (construcción 3.5).

Tabla 51: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) que contiene cruce de CH-CL sin residuos cargados (construcción 3.5).

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
171	Secuencia de nucleótidos, ligando dimérico (71-248) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 25
172	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico (71-248) - CH1	véase la tabla 25
203	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
204	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
173	Ligando dimérico (71-248) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 25
174	Ligando monomérico (71-248) - CH1	véase la tabla 25
205	cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
206	cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47

7.1.8 Preparación de la unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-248) dirigido a CD19(8B8-018) bivalente (construcción 3.6)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-248), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el extremo C de la cadena de ojal Fc de IgG1 humana, como se representa en la **Figura 29C**: ojal Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano. Un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-254) se fusionó con el extremo C de la cadena de botón Fc de IgG1 humana como se describe en la **figura 29D**: botón Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano.

La región variable de secuencias de ADN de cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para CD19, clon 8B8-018, se subclonó sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal, el botón o la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido 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. La combinación de la cadena del ligando dimérico de ojal anti-CD19 huIgG1 que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena del ligando monomérico de botón anti-CD19 huIgG1 que contiene las mutaciones S354C/T366W y la

cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fab de unión a CD19 (figura 30, construcción 3.6).

La tabla 52 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) bivalente (construcción 3.6).

Tabla 52: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la de fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) bivalente (construcción 3.6)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
211	Secuencia de nucleótidos, cadena de ligando dimérico (71- 248) de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAA ACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCG GATACACCTTCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAGGC AGGCCCCTGGCCAAGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTA ACCCATATAATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTC AGGGAAGAGTCACTATGACATCTGACACCAGTATCAGC ACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGAC ACCGCAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCACATATTACTAC GGCTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAACCACA GTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTG TTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG CACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGA CCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTT CTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTT CTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT GGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGC AGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC GTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGA GAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACT GCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGC

		CCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCG GCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAA CTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGT GTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGC TGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCC TGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCA AGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGG GAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCC TGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTC AGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCGG CGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGC TGTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGAC AGGGCATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGC TGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGC TGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAA GAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGT GTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGT GGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCA TCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACT GGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGC CAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGC ATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCAT ACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCA GGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGA GATCCCAGCCGGGCTC
212	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico (71- 248) de botón Fc anti-CD19(8B8-018)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAA ACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCG GATACACCTTCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAGGC AGGCCCCTGGCCAAGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTA

		ACCCATATAATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTC AGGGAAGAGTCACTATGACATCTGACACCAGTATCAGC ACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGAC ACCGCAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCACATATTACTAC GGCTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAACCACA GTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGA CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT TGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGA GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTG GTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCAC CCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTA CTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGG GCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCC CGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGA GAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACT GCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGC CCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTA CAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCG GCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAA CTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGT GTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGC TGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCC TGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCA AGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGG GAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCC TGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTC AGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
204	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
213	cadena de ligando dimérico (71-248) de ojal Fc anti-CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQ APGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVT

		VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQ GMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKED TKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLG GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
214	ligando monomérico (71-248) de botón Fc anti-CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQ APGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQ GMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKED TKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
206	cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 47

7.2 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido a CD19 (maduradas por afinidad derivada de 8B8) y moléculas de control correspondientes

7.2.1 Generación de aglutinantes anti-CD19 madurados por afinidad derivados de 8B8 desprovistos de puntos calientes

7.2.1.1 Selección de anticuerpos específicos de CD19 madurados por afinidad

La desamidación de los residuos de asparagina en las posiciones 27d y 28, localizados en la CDR1 de la cadena ligera del clon 8B8 humanizado, da lugar a una reducción significativa de la actividad biológica. Por lo tanto, se generaron 2 colecciones de presentación en fagos en las que a) se eliminaron ambos residuos de asparagina en las posiciones 27d y 28 y b) se aleatorizaron CDR adicionales de cadena pesada y ligera para seleccionar variantes de 8B8 con una afinidad mejorada.

7.2.1.2 Generación de colecciones de maduración de la afinidad 8B8 sin puntos calientes LCDR1

La generación de anticuerpos derivados de 8B8 madurados por afinidad sin los sitios de desamidación N27d y N28, ubicados en LCDR1, se llevó a cabo por presentación de fagos mediante protocolos estándares (Silacci et al., 2005). En una primera etapa, las secuencias de ADN VL y VH del clon original humanizado 8B8 (SEQ ID NO: 215 y SEQ ID NO: 216) se clonaron en nuestro fagémido que a continuación se usó como plantilla para la aleatorización. En una etapa posterior, se generaron dos colecciones para la selección de clones favorables por presentación de fagos. Para eliminar las posiciones de puntos calientes mencionadas anteriormente, se usó un cebador de aleatorización LCDR1 (SEQ ID NO: 217) que solo permitía los aminoácidos S T Q E en las posiciones

27d y 28 para ambas colecciones. La colección de maduración 1 se aleatorizó en CDR1 y 2 de la cadena ligera y pesada, mientras que la colección de maduración 2 se aleatorizó en CDR1 y 3 de la cadena ligera y en CDR3 de la cadena pesada. Las posiciones aleatorizadas en las respectivas regiones CDR se muestran en la **figura 31A**. Para la generación de la colección de maduración 1, aleatorizada en CDR1 y 2 de la cadena ligera y pesada, se ensamblaron tres fragmentos mediante PCR de "empalme por extensión de superposición" (SOE) y se clonaron en el vector de fago (**figura 31B**). Se utilizaron las siguientes combinaciones de cebadores para generar los fragmentos de la colección: fragmento 1 (LMB3 (SEQ ID NO: 222) y CD19 L1 aleatorio inverso (SEQ ID NO: 217), fragmento 2 (CD19 L2 aleatorio directo (SEQ ID NO: 218) y CD19 H1 aleatorio inverso (SEQ ID NO: 219), y el fragmento 3 (CD19 H2 aleatorio directo (SEQ ID NO: 220) y CD19 H3 constante inverso (SEQ ID NO: 221) (**tabla 53**). Después del ensamblaje de cantidades suficientes de fragmento aleatorizado de longitud completa, se digirió con *NcoI*/*NheI* junto con el vector fagémido aceptor tratado de manera idéntica. Se ligó un exceso molar de 3 veces el inserto de colección con 10 µg de vector fagémido. Se utilizaron ligaduras purificadas para 20 transformaciones que dieron como resultado 2 x109 transformantes. Las partículas de fagémido que presentan la colección de maduración de la afinidad 8B8 se rescataron y se purificaron mediante purificación con PEG/NaCl para usarse para las selecciones.

La generación de la segunda colección, aleatorizada en CDR1 y 3 de la cadena ligera y en CDR3 de la cadena pesada, se realizó de manera similar. Se usaron las siguientes combinaciones de cebadores para generar los fragmentos de la colección: fragmento 1 (LMB3 (SEQ ID NO: 222) y CD19 L1 aleatorio inverso (SEQ ID NO: 217), fragmento 2 (CD19 L1 constante directo (SEQ ID NO223) y CD19 L3 aleatorio inverso (SEQ ID NO224) y fragmento 3 (constante directo de CD19 L3 (SEQ ID NO: 225) y CD19 H3 aleatorio inverso (SEQ ID NO: 226) (**tabla 54**). Después del ensamblaje de cantidades suficientes de fragmento aleatorizado de longitud completa, se digirió con *NcoI*/*Kpn* I junto con el vector fagémido aceptor tratado de manera idéntica. Se ligó un exceso molar de 3 veces el inserto de colección con 20 µg de vector fagémido. Se utilizaron ligaduras purificadas para 40 transformaciones que dieron como resultado 2 x109 transformantes. Las partículas de fagémido que presentan la colección de maduración de la afinidad 8B8 se rescataron y se purificaron mediante purificación con PEG/NaCl para usarse para las selecciones.

Tabla 53: Cebadores para la biblioteca de eliminación de puntos calientes L1_L2/H1_H2 y maduración de la afinidad 8B8

SEQ ID	Denominación	Secuencia
217	aleatoria inversa L1 CD19	CAG CTG CGG GCT CTG ACC CGG TTT CTG GAG ATA CCA GTT CAG 1 CGT 2 GCC 3 GGA 4 TTC CAG AGA TTG GCT GGA TTT GCA AGA AAT G 1: 40 % Y, 6 % A/S/T/G/P/D/N/E/Q/V, 2: 40 % N, 6 % A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 3: 25 % S/T/Q/E, 4: 25 % S/T/Q/E
218	aleatoria directa L2 CD19	CTC CAG AAA CCG GGT CAG AGC CCG CAG CTG CTG ATC TAC 5 GTA TCT 6 CGC 7 8 GGC GTT 9 GAT CGT TTC AGC GGT TCT GGA TCC GGC ACC 5: 30 % R, 20 % E, 5 % A/S/T/Y/G/P/D/N/Q/V. 6: 30 % K, 20 % S, 5 % A/N/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 7: 40 % F, 5 % A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V/I/L, 8: 40 % S, 6,6 % A/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 9: 50 % P, 50 % L
219	aleatoria inversa H1 CD19	CAT CCA CTC CAG ACC CTG GCC CGG GGC CTG ACG AAC CCA 10 CAT 11 12 13 14 GAA 15 GTA ACC AGA TGC TTT GCA GCT CAC TTT AAC GGA AGC 10: 52 % H, 4 % G/A/S/P/T/N/Y/D/E/Q/V/I,11: 30 % I, 15 % Y, 5 % G/A/S/T/P/N/H/D/E/Q/V,12: 52 % Y, 4 % G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 13: 30 % D, 15 % G 5 % A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 14: 52 % T, 4 % G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 15: 52 % T, 4 % G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I
220	aleatoria directa H2 CD19	CAG GCC CCG GGC CAG GGT CTG GAG TGG ATG GGC 16 ATT 17 CCA 18 19 20 21 TCC 22 TAT ACC 23 AAA TTC CAG GGC CGC GTC ACG ATG ACC 16: 45 % Y, 5 % A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 17: 52 % N, 4 % G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 18: 40 % Y, 5 % G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 19: 30 % N, 15 % S, 5 % G/A/T/P/Y/H/D/E/Q/V/I, 20: 30 % D, 15 % G, 5 % A/S/T/P/Y/N/H/E/Q/V/I, 21: 52 % G, 4 % N/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 22: 30 % K,

		15 % N, 4 % G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 23: 30 % E, 15 % Q, 5 % G/A/S/T/P/Y/N/H/D/V/I
221	constante inversa H3 CD19	CGTCACCGGTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAG
222	LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC

Tabla 54: Cebadores para la biblioteca de eliminación de puntos calientes L1_L3/H3 y maduración de la afinidad 8B8

SEQ ID	Denominación	Secuencia
223	constante directa L1 CD19	TGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAG
217	aleatoria inversa L1 CD19	Véase la tabla 53
224	aleatoria inversa L3 CD19	TTT AAT TTC CAG TTT AGT TCC TTG ACC GAA GGT 24 25 26 27 28 29 CTG CAG ACA ATA GTA GAC GCC AAC GTC TTC AGC 24: 52 % Y, 4 % G/A/S/T/N/P/D/E/Q/V/L/I, 25: 52 % P, 4 % G/A/S/T/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 26: 42 % V, 10 % L, 4 % G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I, 27: 52 % H, 4 % G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I, 28: 42 % T, 10 % I, 4 % G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/L, 29: 45 % L, 11 % G, 4 % A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I
225	constante directa L3 CD19	ACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATTAAACG
226	aleatoria inversa H3 CD19	TT GGT GCT AGC AGA GCT TAC GGT CAC CGT GGT ACC TTG GCC CCA GTA ATC AAA 30 31 32 33 34 35 36 37 38 GCG TGC ACA ATA GTA AAC AGC GGT GTC 30: 50 % L, 3,8 % G/A/S/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 31: 50 % A, 4,2 % G/S/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 32: 50 % S, 4,2 % G/A/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 33: 50 % G, 4,2 % S/A/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 34: 50 % Y, 4,2 % G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 35: 50 % Y, 4,2 % G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 36: 50 % Y, 4,2 % G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 37: 50 % T, 4,2 % G/A/Y/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 38: 50 % G 4,2 % Y/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I
222	LMB3	Véase la tabla 53

7.2.1.3 Selección de clones derivados de 8B8 madurados por afinidad desprovistos de los puntos calientes LCDR1 N27d y N28

Para la selección de clones maduros por afinidad desprovistos de los puntos calientes LCDRl N27d y N28, se realizaron dos enfoques de selección por presentación en fagos:

En el primer enfoque, la selección se ejecutó en la proteína de fusión Fc CD19 humana usando ambas colecciones de presentación en fagos. Se realizaron rondas de selección (panning) en solución de acuerdo con el siguiente patrón: 1. unión de ~10^{12} partículas de fagémidos a 30nM de proteína Fc CD19 biotinilada durante 0,5 h en un volumen total de 1 ml, 2, captura de proteína Fc CD19 biotinilada y partículas de fagos específicamente unidas mediante la adición de 5,4 × 10^7 perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina durante 10 min, 3, lavado de perlas usando 5 × 1 ml de PBS/Tween20 y 5× 1 ml de PBS, 4, elución de las partículas de fagos mediante la adición de 1 ml de TEA100 mM (trietilamina) durante 10 min y neutralización mediante la adición de 500 µl 1M de Tris/HCl pH7,4, 5, reinfección con bacterias *E. coli* TG1 en crecimiento exponencial, y 6, infección por el fago auxiliar VCSM13 y posterior precipitación en PEG/NaCl de partículas de fagémidos para su uso en las rondas de selección subsiguientes. Las selecciones se llevaron a cabo más de 3 rondas usando concentraciones decrecientes de antígeno (30 x 10^{-9} M, 10 x 10^{-9} M y 3 x 10^{-9} M). En la ronda 2 y 3, la captura de los complejos antígeno-fago se realizó usando placas de neutravidina en lugar de microsesferas de estreptavidina. Las placas de neutralvidina se lavaron con 5 x PBS/Tween20 y 5 x PBS. En la ronda 3, la placa de neutravidina se incubó durante la noche en 2 litros de PBS para una selección "sin velocidad" antes de que se eluyera el fago de la placa. Además, la proteína del macaco cangrejero Fc CD19 se usó en la ronda 2 para enriquecer los aglutinantes de reacción cruzada.

En el segundo enfoque de selección, la selección de fagos se ejecutó en células que expresan transitoriamente el ECD de CD19 humano o de macaco cangrejero en la superficie celular. Para la transfección transitoria de células

HEK, se generaron plásmidos de expresión que albergan las secuencias de ADN (de 5' a 3') para los siguientes segmentos de proteínas: Una marca Flag, una marca SNAP, el CD19 ECD de origen humano o de macaco cangrejero y la región transmembranal del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) (SEQ ID NO: 227 y 228). La expresión de las proteínas respectivas (SEQ ID NO: 229 y 230) en la superficie celular se confirmó por citometría de flujo usando un anticuerpo anti-Flag para la detección. Ambas colecciones se expusieron en la primera ronda de selección a células que expresaban la fusión proteica que contiene CD19 ECD humana o de macaco cangrejero. Para las siguientes rondas de selección (panning), las especies de CD19 ECD se alternaron en consecuencia. Se usaron células transfectadas transitoriamente con una proteína de membrana irrelevante para el aclaramiento previo.

Se realizaron rondas de selección (panning) de acuerdo con el siguiente patrón:

1. Transfección de células HEK con construcciones que expresan CD19 ECD o una proteína transmembranal irrelevante de acuerdo con el procedimiento estándar descrito anteriormente.

2. La incubación de las células durante 48 h en total a 37 °C en una incubadora con una atmósfera al 5 % de CO_2, 3. Aislamiento de células por centrifugación (3 min a 250 × g) y resuspensión de 1 × 10E7 CD19 ECD de células positivas y 1 × 10E7 de células negativas en PBS/5 % BSA, respectivamente,

3. Eliminación previa de fagos inespecíficos por incubación de la colección de fagos con 1 × 107 de células negativas CD19 durante 60 min a 4°C usando un rotador de tubo que gira suavemente,

4. Centrifugación de células a 250 × g durante 3 min y transferencia del sobrenadante a un tubo nuevo y adición de 1 × 10E7 células positivas para CD19 e incubación durante 60 min a 4°C mediante rotación suave en un rotador de tubo.

5. Lavado de células por centrifugación durante 1 min a 250 × g, aspiración del sobrenadante y resuspensión en 1 ml de PBS (8 veces),

6. Elución de fago con 1 ml de TEA100 mM, incubación durante 5 min a TA y neutralización del eluido con 500 ul de Tris-HCl 1 M, pH 7,6,

7. reinfección de *bacterias E. coli* TG1 de crecimiento exponencial, y

8. infección con fago auxiliar VCSM13 y posterior precipitación con PEG/NaCl de partículas de fagémido que se van a usar en rondas de selección posteriores. Las selecciones se llevaron a cabo en 3 rondas.

Para ambos enfoques de selección, ELISA identificó aglutinantes específicos de la siguiente manera: Se recubrieron 100 ul de proteína Fc CD19 biotinilada 30 nM por pocillo en placas con neutravidina. Se añadieron sobrenadantes bacterianos que contenían Fab y se detectaron los Fab de unión por medio de sus marcas Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP.

Los clones que dieron positivos en el ELISA en CD19 humano recombinante se probaron además en un ELISA basado en células usando células que se transfectaron transitoriamente con el plásmido de expresión que contiene ECD de CD19 humano (SEQ ID NO: 227). Este análisis se realizó como sigue: 48 h después de la transfección, las células HEK se recolectaron y se centrifugaron a 250 x g durante 5 min. A continuación, las células se volvieron a suspender en PBS BSA enfriado con hielo al 2 % hasta 4 x 10^6 células/ml y se incubaron durante 20 min en hielo para bloquear los sitios de unión inespecíficos. 4 × 10^5 células en 100 ul se distribuyeron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se centrifugaron a 250 x g y 4°C durante 3 min. Se aspiró el sobrenadante y se diluyeron 50 ul de sobrenadante bacteriano que contenía fragmentos Fab diluidos con 50 ul de PBS/BSA al 2 % enfriado en hielo, se añadieron a la placa, se mezclaron con las células y se incubaron durante 1 h a 4 ºC. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS enfriado con hielo antes de que se añadieran 100 µl de PBS BSA al 2 % por pocillo que contenía una dilución de anticuerpo anti-Fab-HRP de 1:2000. Después de un tiempo de incubación de 1 h, las células se lavaron nuevamente 3 veces con PBS enfriado con hielo. Para el desarrollo, se añadieron 100 ul de sustrato "ultra TMB-ELISA de 1 etapa" por pocillo. Después de un tiempo de incubación de 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos que contenía 40 ul de H_2SO4 1 M por pocillo y se midió la absorbancia a 450 nM. Los clones que mostraron señales significativas sobre el fondo se sometieron a un experimento de cribado cinético mediante análisis SPR usando ProteOn XPR36.

7.2.1.4 Identificación de variantes derivadas de 8B8 maduradas por afinidad mediante SPR

Para caracterizar adicionalmente los clones que dieron positivos en el ELISA, se midió la tasa de desviación por resonancia de plasmón superficial y se comparó con el clon humanizado original 8B8.

Para este experimento, se inmovilizaron 7000 RU de anticuerpo policlonal anti-Fab humano en los 6 canales de un chip GLM mediante acoplamiento de amina (acetato de Na pH4.5, 25 µl/min, 240 s) (orientación vertical). Cada

sobrenadante bacteriano que contenía anticuerpo se filtró y se diluyó 2 veces con PBS, y a continuación se inyectó durante 360 s a 25 µl/minuto para lograr niveles de inmovilización de entre 100 y 400 unidades de respuesta (RU) en orientación vertical. Inyección de Fc CD19 monomérico: Para mediciones de cinética con dosis única, la dirección de la inyección se cambió a orientación horizontal, se inyectaron simultáneamente series de dilución triple de Fc CD19 monomérico purificado (rangos de concentración variables entre 150 y 6 nM) a 50 µl/min a lo largo de canales separados 1-4, con tiempos de asociación de 180 s y tiempos de disociación de 300 s. Se inyectó un fragmento Fc de IgG humano (150 nM) en el canal 5 como control negativo para la unión específica al tampón Fc CD19 monomérico (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco «en línea» para la referencia. La regeneración se realizó mediante dos pulsos de glicina 10 mM pH1,5 y NaOH50 mM durante 30 s a 90 ul/min (orientación horizontal). Se calcularon las constantes de velocidad de disociación (k_{dis}) usando un modelo de Langmuir sencillo de unión uno a uno en el programa informático ProteOn Manager v 3.1 ajustando simultáneamente los sensogramas. Se identificaron los clones que expresan Fabs con las constantes de velocidad de disociación más lentas (**Tabla 55**). Es de destacar que las constantes de velocidad de disociación de los clones 5A07 y 5B08 no se pudieron determinar debido a un ajuste inadecuado. No obstante, se seleccionaron ambos clones porque los resultados obtenidos sugirieron una disociación muy lenta. Se secuenciaron los dominios variables de los fagémidos correspondientes. Es importante destacar que ambos residuos de asparagina en LCDR1 (posición 27d y 28) se reemplazaron por una serina o una treonina, lo que demuestra que se eliminaron ambos sitios de desamidación. Un ejemplo de una alineación se muestra en la **figura 32**. Las CDR de los mejores clones se enumeran en la **Tabla 56** (regiones variables de la cadena ligera) y la **Tabla 57** (regiones variables de la cadena pesada) (clon 5H09: (SEQ ID NO: 231-236); clon 7H07: (SEQ ID NO: 237-242); clon 2B03: (SEQ ID NO: 243-248); clon 2B11: (SEQ ID NO: 249-254); clon 5A07: (SEQ ID NO: 255-260); clon 5B08: (SEQ ID NO: 261-266); clon 5D08: (SEQ ID NO: 267-272).

Tabla 55: Constantes de disociación de clones seleccionados obtenidos en análisis de cribado con sobrenadante bacteriano

clon	Constante de disociación kd (1/s)
8B8 original	3,01E-4
5H09	2,58E-4
7H07	5,75E-5
2B03	3,24E-5
2B11	4,37E-6
5A07	n.d.
5B08	n.d.
5D08	1,95E-4

Tabla 56: Secuencias de CDR de las cadenas ligeras 8B8 seleccionadas

clon	SEQ ID NO	CDR-L1	SEQ ID NO	CDR-L2	SEQ ID NO	CDR-L3
5H09	231	KSSQSLESSTGNTYLN	232	RVSKRFS	233	LQLIDYPVT
7H07	237	KSSQSLETSTGNTYLN	238	RVSKRFS	239	LQATHIPYT
2B03	243	KSSQSLETSTGNTYLN	244	RVSKRFS	245	LQLTHVPYT
2B11	249	KSSQSLETSTGNTYLN	250	RVSKRFS	251	LQLLEDPYT
5A07	255	KSSQSLETSTGNTYLN	256	RVSKRFS	257	LQPGHYPGT
5B08	261	KSSQSLETSTGNTYLN	262	RVSKRFS	263	LQLDSYPNT
5D08	267	KSSQSLETSTGNTYLN	268	RVSKRFS	269	LQLTHEPYT

Tabla 57: Secuencias de CDR de las cadenas pesadas de 8B8 seleccionadas

clon	SEQ ID NO	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3
5H09	234	DYIMH	235	YINPYNDGSKYTEKFQG	236	GTYYYGSALFDY
7H07	240	DYIMH	241	YINPYNDGSKYTEKFQG	242	GTYYYGSELFDY
2B03	246	DYIMH	247	YINPYNDGSKYTEKFQG	248	GTYYYGPDLFDY

2B11	252	DYIMH	253	YINPYNDGSKYTEKFQG	254	GTYYYGPQLFDY
5A07	258	DYIMH	259	YINPYNDGSKYTEKFQG	260	GTYYYGSALFDY
5B08	264	DYIMH	265	YINPYNDGSKYTEKFQG	266	GTYYYGPQLFDY
5D08	270	DYIMH	271	YINPYNDGSKYTEKFQG	272	GTYYYGSELFDY

7.2.2 Caracterización de anticuerpos derivados de 8B8 madurados por afinidad

7.2.2.1 Clonación de dominios de anticuerpos variables en vectores de expresión

Se subclonaron las regiones variables de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera de los aglutinantes anti-CD19 seleccionados en el marco de la cadena pesada constante o de la cadena ligera constante de la IgG1 humana. En la cadena pesada, se han introducido mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala con el fin de anular la unión a los receptores Fc gamma de acuerdo con el procedimiento descrito en la publicación de patente internacional n.º WO2012/130831.

Las secuencias de ADNc y de aminoácidos de las IgG anti-CD19 se muestran en la **Tabla 58** y en la **Tabla 59**, respectivamente. Todas las secuencias codificantes de anticuerpos se clonaron en un vector de expresión, que dirige la transcripción del inserto con un promotor MPSV quimérico y contiene una secuencia señal poliA sintética ubicada en el extremo 3' del CDS. Además, el vector contiene una secuencia de EBV OriP para el mantenimiento episomal del plásmido.

Tabla 58: Secuencias de ADNc y de aminoácidos del clon 8B8 anti-CD19 en formato de IgG1 humana P329GLALA

SEQ ID NO:	Clon y cadena	Secuencia
273	Cadena ligera original 8B8	GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGA GATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTTGAAAACAGT AATGGAAACACCTATTTGAACTGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTC TCCACAACTCCTGATCTACAGGGTTTCCAAACGATTTTCTGGGGTCCT AGACAGGTTCAGTGGTAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAA TCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTTCTGCCTACAA CTTACACATGTCCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAAT AAAA*CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG* *AGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT* *ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG* *GGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT* *ACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC* *AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC* *AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT*

274	cadena pesada original 8B8	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGC TTCAGTGAAGATGGCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTA TATTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGACTGGGCAGGGCCTTGAGTGGA TTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTTCTAAGTACACTGAGAAGT TCAACGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCTTCCATCACAGCC TACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTAC TGTGCAAGAGGGACCTATTATTATGGTAGCGCCCTCTTTGACTACTGG GGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCG*GCTAGCACCAAGGGCCCA* *TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC* *GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG* *TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG* *TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC* *TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC* *CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA* *CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC* *AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC* *CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG* *GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC* *AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC* *CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA* *GGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG* *CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG* *GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT* *TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA* *GAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT* *TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA*
		CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA *GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA*
275	Cadena ligera original 8B8	DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLENSNGNTYLNWYLQKPGQSP QLLIYRVSKRFSGVLDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCLQLTHVP YTFGGGTKLEIK*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW* *KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL* *SSPVTKSFNRGEC*
276	cadena pesada original 8B8	EVQLQQSGPELVKPGASVKMACKASGYTFTDYIMHWVKQKTGQGLEWI GYINPYNDGSKYTEKFNGKATLTSDKSSITAYMELSSLTSEDSAVYYCAR GTYYYGSALFDYWGQGTTLTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL* *VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC* *NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL* *MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV* *SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD* *ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK* *LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Tabla 59: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de clones anti-CD19 madurados por afinidad en formato de IgG1 humana P329GLALA

277	cadena ligera 2B11	GATATTGTCATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCCGGGT CAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAAACCTCC ACCGGCACCACGTACCTGAACTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAG CCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCC TGATCGTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAAT CAGCCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCT GCTGGAAGATCCATACACCTTCGGTCAAGGAACGAAACTGGAAATTA AACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGG ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
278	cadena pesada 2B11	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGC TTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTA TATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGA TGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAA TTCCAGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCG TACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTAT TGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTGG GGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC CCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC AAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA
		AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
279	cadena ligera 2B11	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLNWYLQKPGQSPQL LIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLLEDPY TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
280	cadena pesada 2B11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEW MGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC ARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK

281	cadena ligera 7H07	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCCGGGT CAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAAACCTCC ACCGGCAACACGTACCTGAACTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAG CCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCC TGATCGTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAAT CAGCCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGG CAACCCATATCCCATACACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATT AAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT GAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGA CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
282	cadena pesada 7H07	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGC TTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTA TATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGA TGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAA TTCCAGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCG TACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTAT TGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTTCTGAACTGTTTGATTACTGG GGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC
		CCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC AAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
283	cadena ligera 7H07	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKPGQSPQL LIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQATHIPYT FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

284	cadena pesada 7H07	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEW MGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC ARGTYYYGSELFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
285	cadena ligera 2B03	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCCGGGT CAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAAACCTC CACCGGCAACACGTACCTGAACTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGA GCCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTC CTGATCGTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAA TCAGCCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAG TTGACCCACGTTCCGTACACCTTCGGTCAAGGAANNAAACTGGAAAT TAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCC TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
286	cadena pesada 2B03	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGC TTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTA TATCACGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGA TGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAA TTCCAGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGC GTACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTA TTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCAGATCTGTTTGATTACTG
		GGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC CAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG AAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
287	cadena ligera 2B03	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKPGQSPQ LLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVP YTFGQGXKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

288	cadena pesada 2B03	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYITHWVRQAPGQGLEW MGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC ARGTYYYGPDLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
289	cadena ligera 5A07	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCCGGGT CAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAAACCTC CACCGGCAACACGTACCTGAACTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGA GCCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTC CTGATCGTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAA TCAGCCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAG CCAGGTCATTACCCAGGTACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAAT TAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCC TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
290	cadena pesada 5A07	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGC TTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTA TATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGA
		TGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAA TTCCAGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGC GTACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTA TTGTGCACGCGGTACTTACTACTACGGTTCCGCCCTCTTTGATTACTG GGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC CAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG AAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
291	cadena ligera 5A07	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKPGQSPQ LLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQPGHYP GTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

292	cadena pesada 5A07	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEW MGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC ARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
293	cadena ligera 5D08	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCCGGGT CAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAAACCTC CACCGGCAACACGTACCTGAACTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGA GCCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTC CTGATCGTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAA TCAGCCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAG CTGACCCATGAACCATACACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAAT TAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCC TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG
		CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
294	cadena pesada 5D08	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGC TTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTA TATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGA TGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAA TTCCAGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGC GTACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTA TTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTTCTGAACTGTTTGATTACTG GGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC CAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG AAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
295	cadena ligera 5D08	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKPGQSPQ LLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHEP YTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

296	cadena pesada 5D08	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEW MGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC ARGTYYYGSELFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
297	cadena ligera 5B08	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCCGGGT CAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAAACCTC CACCGGCAACACGTACCTGAACTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGA GCCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTC CTGATCGTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAA TCAGCCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAG CTGGATTCTTACCCAAACACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAAT TAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA
		CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCC TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
298	cadena pesada 5B08	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGC TTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTA TATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGA TGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAA TTCCAGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGC GTACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTA TTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTG GGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC CAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG AAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
299	cadena ligera 5B08	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKPGQSPQ LLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLDSYP NTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

300	cadena pesada 5B08	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEW MGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC ARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
301	cadena ligera 5H09	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCCGGGT CAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAATCTTCC ACCGGCAACACGTACCTGAACTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAG CCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCC TGATCGTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAAT
		CAGCCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGC TGATCGATTACCCAGTTACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATT AAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT GAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCC TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
302	cadena pesada 5H09	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGC TTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTA TATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGA TGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAA TTCCAGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGC GTACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTA TTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTTCTGCACTGTTTGATTACTG GGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC CAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG AAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

303	cadena ligera 5H09	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLESSTGNTYLNWYLQKPGQSPQ LLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLIDYP VTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
304	cadena pesada 5H09	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEW MGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC ARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

7.2.2.2 Determinación de la afinidad de anticuerpos seleccionados por SPR

Para la determinación exacta de las afinidades por SPR, los anticuerpos anti-CD19 seleccionados se produjeron mediante la co-transfección de células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamíferos utilizando polietilenimina. Se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión en una proporción 1:1 ("vector de cadena pesada": "vector de cadena ligera") de acuerdo con el procedimiento estándar. 7 días después de la transfección, se midió el título de anticuerpos en el sobrenadante y todos los títulos se equilibraron a 10 µg/ml.

La afinidad (K_D) del anticuerpo original 8B8 así como sus derivados se midió mediante SPR usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25ºC. Se inmovilizaron 7000 RU de anticuerpo policlonal anti-Fab humano en los 6 canales de un chip GLM mediante acoplamiento de amina (acetato de Na pH4,5, 25 ul/min, 240 s) (orientación vertical). Cada sobrenadante de HEK que contenía anticuerpo se filtró, se diluyó con PBST (10 mM de fosfato, 150 mM de cloruro de sodio pH 7,4, Tween 20 al 0,005 %) a una concentración de 10 ug/ml, y luego se inyectó durante 360 s a 25 µl/minuto para lograr niveles de inmovilización entre 500 y 800 unidades de respuesta (RU) en orientación vertical. Inyección de Fc CD19 monomérico: Para mediciones de cinética con dosis única, se cambió la dirección de inyección a la orientación horizontal, se inyectaron simultáneamente tres series de dilución de Fc CD19 monomérico purificado (intervalos de concentración variables entre 150 y 6 nM) a 50 µl/min a lo largo de canales 1-4 separados, con tiempos de asociación de 180 s y tiempos de disociación de 300 s. Se inyectó un fragmento Fc de IgG humana (150 nM) en el canal 5 como control negativo para la unión específica a Fc CD19 monomérico. Se inyectó el tampón (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco "en línea" como referencia. Una vista general de los sensogramas respectivos se ilustra en la **Figura 33.** La regeneración se realizó mediante dos pulsos de glicina 10 mM pH 1,5 y NaOH 50 mM durante 30 s a 90 ul/min (orientación vertical). Se calcularon las constantes de velocidad de asociación (k_{as}) y las constantes de velocidad de disociación (k_{dis}) usando un modelo de Langmuir sencillo de unión uno a uno en el programa informático ProteOn Manager v3,1 ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. Se calculó la constante de disociación en equilibrio (K_D) como la proporción k_{dis}/k_{as}. En la **Tabla 60** se muestra un resumen de los datos cinéticos y termodinámicos. La constante de disociación de todos los clones maduros por afinidad mejoró en comparación con su clon original 8B8.

Tabla 60: Resumen de los datos cinéticos y termodinámicos para la interacción entre anti-CD19 hulgG1 y CD19 humano

clon	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD (M)**
8B8 original	5,66E+4	1,34E-4	2,36E-9
5H09	7,91E+4	1,50E-5	1,89E-10
7H07	7,45E+4	5,57E-5	7,47E-10
2B03	6,02E+4	5,00E-5	8,31E-10
2B11	6,34E+4	3,14E-5	4,95E-10
5A07	6,98E+4	3,07E-5	4,40E-10

5B08	6,81E+4	5,26E-5	7,72E-10
5D08	8,88E+4	8,44E-5	9,51E-10

7.2.2.3 Preparación y purificación de anti-CD19 IgG1 P329G LALA

Los anticuerpos anti-CD19 seleccionados se produjeron cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamífero usando polietilenimina. Se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión en una proporción 1:1 ("vector de cadena pesada": "vector cadena ligera").

Para la producción en matraces de agitación de 500 ml, se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Antes de la transfección, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 210 x g y el sobrenadante se reemplazó por medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión (200 µg de ADN total) se mezclaron en 20 mL de medio CD CHO. Después de la adición de 540 µL de PEI, la solución se agitó en vórtex durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezclaron las células con la solución ADN/PEI, se transfirieron a un matraz de agitación de 500 mL y se incubó durante 3 horas a 37°C en una incubadora con una atmósfera de CO2 al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 160 ml de medio F17 y las células se cultivaron durante 24 horas. Un día después de la transfección, se añadieron 1 mM de ácido valproico y Feed al 7 %. Después de cultivarse durante 7 días, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación durante 15 minutos a 210 x g. La solución se filtró en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm), se suplementó con acida sódica hasta una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantuvo en 4 °C.

La purificación de moléculas de anticuerpo a partir de sobrenadantes de cultivos celulares se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad usando proteína A como se describe anteriormente para la purificación de fusiones de antígeno Fc. Se concentró la proteína y se filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con 20 mM de histidina, 140 mM de cloruro de sodio con pH 6,0.

La concentración de proteína de los anticuerpos purificados se determinó midiendo la DO a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos. La pureza y el peso molecular de los anticuerpos se analizaron mediante CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor (Invitrogen, EE.UU.) usando un LabChipGXII (Caliper). El contenido agregado de las muestras de anticuerpos se analizó usando una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en 25 mM de K_2HPO_4, 125 mM de NaCl, 200 mM de monoclorhidrato de L-arginina, NaN_3 al 0,02 % (p/v), tampón de funcionamiento de pH6,7 a 25 °C (**Tabla 61**).

Tabla 61: Análisis bioquímico de clones IgG1 de P329G LALA anti-CD19

Clon	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%]	CE-SDS (no rojo)
8B8 original	25,3	100	99,1
2B11	35,4	100	98,4
7H07	89,8	100	99,4
2B03	182	100	100
5A07	90,2	100	99,4
5D08	90,2	100	99,3
5B08	24,1	99,6	100
5H09	29,9	100	98,1

Para la preparación de construcciones biespecíficas se eligió el clon 2B11 porque carece de los tres puntos calientes de desamidación.

La secuencia de ADN que codifica parte del ectodominio (aminoácidos 71-254 y 71-248) del ligando humano 4-1BB se sintetizó de acuerdo con la secuencia P41273 de la base de datos Uniprot.

7.2.3 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-254) dirigido a CD19 (8B8-2B11) monovalente con dominios CH1-CL cruzados con residuos cargados (construcción 4.1)

La construcción 4.1 se preparó como se describe para la construcción 3.1 (**Figura 30**), pero usando la región variable de secuencias de ADN de cadena pesada y ligera que codifican un ligante específico para CD19, clon 8B8-2B11.

La **tabla 62** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CD19 (8B8-2B11) monovalente con CH-CL cruzado y residuos cargados (construcción 4.1).

Tabla 62: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-2B11) monovalente que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 4.1). * para residuos cargados

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
129	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
130	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
305	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAA ACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGG TTACACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCA GGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTA ACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTC CAGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCC ACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGAC ACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTAC GGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACG GTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTG TTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG CACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGA CCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTT CTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTT CTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT GGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGC AGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC GTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA

277	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 59
115	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
116	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
306	cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQ APGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
279	cadena ligera anti-CD19(8B8-2b11)	véase la tabla 59

7.2.4 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-254) dirigido a CD19 (8B8-2B11) monovalente con dominios CH1-CL cruzados sin residuos cargados (construcción 4.2)

La construcción 4.2 se preparó como se describe para la construcción 3.2 (**Figura 30**), pero usando la región variable de secuencias de ADN de cadena pesada y ligera que codifican un ligante específico para CD19, clon 8B8-2B11.

La **tabla 63** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-2B11) monovalente que contiene cruce de CH-CL cruzado sin residuos cargados (construcción 4.2).

Tabla 63: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CD19 (8B8-2B11) monovalente que contiene cruce de CH-CL sin residuos cargados (construcción 4.2).

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
165	Secuencia de nucleótidos, ligando dimérico (71-254) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 22
166	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1	véase la tabla 22
305	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 62
277	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 59
117	Ligando dimérico	véase la tabla 22

	(71-254) - CL cadena de botón Fc	
118	Ligando monomérico (71-254) - CH1	véase la tabla 22
306	cadena de ojal Fc anti-Cd19(8B8-2B11)	véase la tabla 62
279	cadena ligera anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 59

7.2.5 Preparación de la unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-254) dirigido a CD19(8B8-2B11) bivalente (construcción 4.3)

La construcción 4.3 se preparó como se describe para la construcción 3.3 (figura 30), pero usando la región variable de secuencias de ADN de cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para CD19, clon 8B8-2B11.

La **tabla 64** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CD19 (8B8-2B11) bivalente (construcción 4.3).

Tabla 64: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de PGLALA (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-2B11) bivalente (construcción 4.3)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
307	Secuencia de nucleótidos, cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAA ACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGG TTACACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCA GGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTA ACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTC CAGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCC ACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGAC ACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTAC GGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACG GTGACCGTAAGCTCT*GCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGT* *TCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCAC* *AGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAG* *CCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCG* *GCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCT*

		GTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCC *TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC* *AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCT* *GCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA* *GCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC* *CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT* *GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA* *GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA* *AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG* *TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA* *ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC* *GGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC* *AGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCG* *GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCA* *GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA* *GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT* *CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAA* *GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC* *TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA* *CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGC* *GGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTG* *AGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGG* *GCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATC* *GATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTG* *GCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACAC* *CAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTG* *TTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAG* *GATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTG* *AGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG* *ATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTT* *GGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGA* *GGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACA* *CGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG* *TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCC* *AAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATC* *TAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGG* *CTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGG* *CTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTAC* *TCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGAC* *TGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAA* *GCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCG* *GGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCT* *CTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTG* *CACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAG* *GCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGC* *ATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATAC* *TGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGG* *GCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCC* *TGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA*

308	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11)	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAA ACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGG TTACACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCA GGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTA ACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTC
		CAGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCC ACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGAC ACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTAC GGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACG GTGACCGTAAGCTCT*GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT* *TCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC* *AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA* *CCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG* *GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC* *TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT* *GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA* *GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT* *GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGC* *TGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCA* *AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC* *GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT* *TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA* *GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT* *GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA* *ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC* *GGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC* *AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAG* *AGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGG* *TCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGA* *GAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCC* *CCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAA* *ACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTG* *TTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA* *CACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGG* *CGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCT* *GAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAG* *GGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT* *CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCT* *GGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACA* *CCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGT* *GTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAA* *GGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCT* *GAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTG* *GATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATT* *TGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAG* *AGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGAC* *ACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCT* *GTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTC* *CAAGAAGCGAA*
277	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 59

309	cadena de ligando dimérico de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQ APGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVT VSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSR EGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQ GRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE*
310	ligando monomérico de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQ APGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVT VSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGS REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLPSPRSE*
279	cadena ligera anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 59

7.2.6 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-248) dirigido a CD19(8B8-2B11) monovalente con dominios CH1-CL cruzados con residuos cargados (construcción 4.4)

La construcción 4.4 se preparó como se describe para la construcción 3.4 (figura 30), pero usando la región variable de secuencias de ADN de cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para CD19, clon 8B8-2B11.

La **tabla 65** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19 (8B8-2B11) monovalente con CH-CL cruzado y residuos cargados (construcción 4.4).

Tabla 65: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) trimérico 15 dividido dirigido a CD19 (8B8-2B11) monovalente que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 4.4). * residuos cargados

169	Secuencia de nucleótidos, ligando dimérico (71-248) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 24
170	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1*	véase la tabla 24
305	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 62
277	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 59
119	Ligando dimérico (71-248) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 24
120	Ligando monomérico (71-248) - CH1*	véase la tabla 24
306	cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 62
279	cadena ligera anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 59

7.2.7 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-248) dirigido a CD19 (8B8-2B11) monovalente con dominios CH1-CL cruzados sin residuos cargados (construcción 4.5)

La construcción 4.5 se preparó como se describe para la construcción 3.5 (figura 30), pero usando la región variable de secuencias de ADN de cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para CD19, clon 8B8-2B11.

La **tabla 66** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-2B11) monovalente que contiene cruce de CH-CL cruzado sin residuos cargados (construcción 4.5).

Tabla 66: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248)trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-2B11) monovalente que contiene cruce de CH-CL sin residuos cargados (construcción 4.5).

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
171	Secuencia de nucleótidos, ligando dimérico (71-248) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 25
172	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico (71-248) - CH1	véase la tabla 25
305	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 62
277	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 59
173	Ligando dimérico (71-248) - CL cadena	véase la tabla 25

	de botón Fc	
174	Ligando monomérico (71-248) - CH1	véase la tabla 25
306	cadena de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 62
279	cadena ligera anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 59

7.2.8 Preparación de la unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-248) dirigido a CD19(8B8-2B11) bivalente (construcción 4.6)

La construcción 4.6se preparó como se describe para la construcción 3.6 (figura 30), pero usando la región variable de secuencias de ADN de cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para CD19, clon 8B8-2B11.

La **tabla 67** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-2B11) bivalente (construcción 3.6).

Tabla 67: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la de fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-2B11) bivalente (construcción 4.6)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
311	Secuencia de nucleótidos, cadena de ligando dimérico (71- 248) de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAA ACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGG TTACACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCA GGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTA ACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTC CAGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCC ACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGAC ACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTAC GGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACG GTGACCGTAAGCTCT*GCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGT* *TCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCAC* *AGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAG* *CCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCG* *GCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCT* *GTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCC* *TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC* *AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCT* *GCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA* *GCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC* *CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT* *GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA* *GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA* *AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG*

		TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC GGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCG GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCA GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGC GGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTG AGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGG GAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATC GATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTG GCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACAC CAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTG TTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAG GATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTG AGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTT GGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGA GGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACA CGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCG GCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCT GTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAG GGCATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGAT TGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCA GGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATAC AAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGT TTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGG CTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGC GCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGA CCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCG GGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCG CCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCAT GCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGT TTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC

312	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico (71-248) de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11)	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAA ACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGG TTACACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCA GGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTA ACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTC CAGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCC ACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGAC ACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTAC GGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACG GTGACCGTAAGCTCT*GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT* *TCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC* *AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA* *CCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG* *GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC* *TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT* *GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA* *GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT* *GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGC* *TGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCA* *AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC* *GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT* *TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA* *GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT* *GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA* *ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC* *GGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC* *AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAG* *AGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGG* *TCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGA* *GAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCC* *CCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAA* *ACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTG* *TTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA* *CACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGG* *CGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCT* *GAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAG* *GGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT* *CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCT* *GGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACA* *CCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGT* *GTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAA* *GGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCT* *GAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTG* *GATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCAT* *TTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCA* *GAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGA* *CACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCC* *TGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC*
277	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CD19(8B8-2B11)	véase la tabla 59

313	cadena de ligando dimérico (71-248) de ojal Fc anti-CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQ APGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVT VSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSR EGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQ GRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQL VAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL*
314	ligando monomérico (71-248) de botón Fc anti-CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQ APGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVT VSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGS REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGL*
279	cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 59

7.3 Preparación de la fusión Fc del ligando 4-1BB trimérico dividido no dirigido e IgG humana como moléculas de control

7.3. 1 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB humano no dirigido (moléculas de control)

Estas moléculas de control se prepararon como se describe anteriormente para la construcción 3.1 dirigida a CD19 (denominado control B), 3.3 (denominado control C), 3.4 (denominado control D) y 3.5 (denominado control E) con la única diferencia de que el aglutinante anti-CD19 (VH-VL) se reemplazó por un control de línea germinal, denominado DP47, que no se une al antígeno (véase la figura 30).

La **tabla 68** muestra, respectivamente, las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente que contiene CH-CL cruzado con residuos cargados, control B.

La **tabla 69** muestra, respectivamente, las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido no dirigido a DP47 bivalente, control C.

La **tabla 70** muestra, respectivamente, las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados, control D.

La **tabla 71** muestra, respectivamente, las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente sin residuos cargados en el cruce de CH-CL, control E.

Tabla 68: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) humano trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente con cruce de CH-CL y con residuos cargados (control B). * residuos cargados

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
96	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
97	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
79	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc DP47	véase la tabla 18
80	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera DP47	véase la tabla 18
98	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
99	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
81	cadena de ojal Fc DP47	véase la tabla 18
82	cadena ligera DP47	véase la tabla 18

Tabla 69: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) humano trimérico dividido no dirigido a DP47 bivalente (control C).

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
177	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-254)	véase la tabla 27
178	Secuencia de nucleótidos, cadena de botón Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-254)	véase la tabla 27
80	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera DP47	véase la tabla 18
179	cadena de ojal Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu dimérico (71-254)	véase la tabla 27
180	cadena de botón Fc DP47 fusionada con 4-1BBL hu monomérico (71-254)	véase la tabla 27
82	cadena ligera DP47	véase la tabla 18

Tabla 70: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248) humano trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente con cruce de CH-CL y con residuos cargados (control D). * residuos cargados

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
169	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-248)- CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 24
170	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1*	véase la tabla 24
79	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc DP47	véase la tabla 18
80	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera DP47	véase la tabla 18
119	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 24
120	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 24
81	cadena de ojal Fc DP47	véase la tabla 18

82	cadena ligera DP47	véase la tabla 18

Tabla 71: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248) humano trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente con cruce de CH-CL y sin residuos cargados (control E).

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
171	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 25
172	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1	véase la tabla 25
79	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc DP47	véase la tabla 18
80	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera DP47	véase la tabla 18
173	4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 25
174	4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1	véase la tabla 25
81	cadena de ojal Fc DP47	véase la tabla 18
82	cadena ligera DP47	véase la tabla 18

7.3.2 Anticuerpos como moléculas de control

Se prepararon dos IgG1humanas de control que contenían PGLALA.

La **tabla 72** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos del anti-CD19 PGLALA huIgG1 (clon 8B8-018), es decir, el control G.

La **tabla 73** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos del control de la línea germinal DP47 PGLALA huIgG1 (control F).

Tabla 72: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de anti-CD19(8B8-018) PGLALA huIgG1 (control G)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
315	Secuencia de nucleótidos, cadena pesada CD19(8B8-018) (PGLALA huIgG1)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGT CAAGAAACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCAT GCAAGGCAAGCGGATACACCTTCACCGACTAT ATCATGCATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCA AGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCAT ATAATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTT CAGGGAAGAGTCACTATGACATCTGACACCAG TATCAGCACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCC TTCGGTCTGATGACACCGCAGTGTATTACTGT

		GCCAGGGGCACATATTACTACGGCTCAGCTCT GTTCGACTATTGGGGGCAGGGAACCACAGTAA CCGTGAGCTCCGCAAGTACTAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAG GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAAGCAGCTGGGGGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCCCCGGGCAAA
204	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera CD19(8B8-018)	véase la tabla 47
316	cadena pesada CD19(8B8-018) (PGLALA huIgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYI MHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKF QGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCA RGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

206	cadena ligera CD19(8B8-018)	véase la tabla 47

Tabla 73: Secuencias de ADNc y de aminoácidos del control de la línea germinal DP47 PGLALA huIgG1 (control F)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
181	Secuencia de nucleótidos, cadena pesada DP47 (PGLALA hu IgG1)	véase la tabla 29
80	cadena ligera DP47	véase la tabla 18
182	cadena pesada DP47 (PGLALA hu IgG1)	véase la tabla 29
82	cadena ligera DP47	véase la tabla 18

7.4 Producción de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc del ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido a CD19 y sus moléculas de control

Las secuencias codificantes de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido dirigido y no dirigido se clonaron en un vector plásmido, que dirige la expresión del inserto a partir de un promotor MPSV y contiene una secuencia poli A sintética localizada en el extremo 3' del CDS. Además, el vector contiene una secuencia de EBV OriP para el mantenimiento episomal del plásmido.

Se produjo la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamífero usando polietilenimina. Se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión. Para las variantes 1, 2, 4, 5 y su control B, D y E, en una proporción de 1:1:1:1 ("vector ligando dimérico-CL-cadena de botón": "vector fusión de ligando monomérico-CH1": "vector Fab anti-CD19-cadena de ojal": "vector cadena ligera anti-CD19"). Para la variante 3, 6 y su control C, a una proporción de 1:1:1 ("vector cadena de ligando dimérico de ojal Fc de huIgG1": "vector cadena de ligando monomérico de botón Fc de huIgG1": "vector cadena ligera anti-CD19"). Las IgG humanas, usadas como control en el ensayo, se produjeron como para la construcción biespecífica (para la transfección solo se usó un vector para la cadena ligera y un vector para la cadena pesada en una proporción de 1:1).

Para la producción en matraces de agitación de 500 mL, se sembraron 300 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, se centrifugaron las células durante 10 minutos a 210 x g y se reemplazó el sobrenadante por 20 mL de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión (200 µg de ADN total) se mezclaron en 20 mL de medio CD CHO. Después de la adición de 540 µL de PEI, la solución se agitó en vórtex durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Después de esto, se mezclaron las células con la solución ADN/PEI, se transfirieron a un matraz de agitación de 500 mL y se incubó durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 160 mL de medio Excell complementado con L-glutamina 6 mM, 5g/L de PEPSOY y ácido valproico 1,2 mM y se cultivaron las células durante 24 horas. Un día después de la transfección se añadió Feed al 12 % (aminoácidos y glucosa). Después de cultivarse durante 7 días, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación durante 30-40 minutos al menos 400 x g. La solución se filtró en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm), se suplementó con acida sódica hasta una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantuvo en 4 °C.

La molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido, así como la IgG, se purificó a partir de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando la proteína A, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, se cargó el sobrenadante en una columna Mab Select Sure (CV = 5-15 mL, resina de GE Healthcare) equilibrado con fosfato de sodio (20 mM), tampón de citrato de sodio (20 mM) (pH 7,5). La proteína no unida se eliminó lavando con al menos 6 volúmenes de columna del mismo tampón. La proteína unida se eluyó usando un gradiente lineal (20 CV) o una elución escalonada (8 CV) con citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, tampón de glicina 100 mM (pH 3,0). Para el gradiente lineal, se aplicó una elución escalonada adicional de 4 volúmenes de columna.

El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/10 (v/v) de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0. La proteína se concentró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, solución Tween20 al 0,01 % (v/v) de pH 6,0.

Se determinó la concentración de proteína midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando un coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos. La pureza y el peso molecular de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dirigido se analizaron mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con Coomassie SimpleBlue™ SafeStain (Invitrogen USA). Se analizó el

contenido en agregado de las muestras usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7 a 25 °C.

La Tabla 74 resume el rendimiento y el contenido final de monómero de las moléculas de antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido dirigido a CD19.

Tabla 74: Análisis bioquímico de moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido dirigido a CD19

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
fusión Fc de ligando 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 3.1)	98	8,6
fusión Fc de ligando 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) bivalente (construcción 3.3)	100	11,3
fusión Fc de ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 3.4)	99	11,5
fusión Fc de ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL sin residuos cargados (construcción 3.5)	97	13,3
fusión Fc de ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) bivalente (construcción 3.6)	96	19,9
fusión Fc de ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-2B11) monovalente que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 4.4)	99,2	21,2

La **tabla 75** resume el rendimiento y el contenido final de monómero de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido no dirigido de DP47, tanto monovalente (control B, D y E) como bivalente (control C).

Tabla 75: Análisis bioquímico de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido no dirigido a DP47

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) humano trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente (control B)	99	15,4
fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) humano trimérico dividido no dirigido a DP47 bivalente (control C)	98	12,6
fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) humano trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente (control D)	99,5	25,9
fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) humano trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente (control E)	93,3	4,1

La **tabla 76** resume el rendimiento y el contenido final de monómero de anti-CD19 (8B8-018) y PGLALA de IgG1 humana línea germinal DP47 (control F).

Tabla 76: Análisis bioquímico de PGLALA de IgG1 humana de control

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
anti-CD19(8B8-018) PGLALA huIgG1	100	36,6
línea germinal DP47 PGLALA de IgG1 humana	100	50

Ejemplo 8

Caracterización funcional de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido a CD19

8.1. Resonancia de plasmón superficial (afinidad)

La unión de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc del ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido a CD19 (construcciones 3.4 y 3.6) a (kih) de Fc 4-1BB recombinante y CD19 se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se realizaron en un Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de migración (HEPES0,01 M, pH7,4, NaCl 0,15 M, EDTA3 mM, tensioactivo P20 al 0.005 %, Biacore, Friburgo/Alemania).

Interacción con 4-1BB humano y de macaco cangrejero

El anticuerpo anti-Fab humano (Biacore, Friburgo/Alemania) se acopló directamente en un chip CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina estándar (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 8000 UR. Las fusiones Fc del ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido a CD19 se capturaron durante 60 segundos a 2 y 5 nM (también se inyectó el control D). El 4-1BB avi His humano o de macaco cangrejero recombinante se pasó a un intervalo de concentración de 2,7 a 2000 nM (diluido 3 veces) con un caudal de 30 µL/minuto a través de las cubetas de lectura durante 120 segundos. Se supervisó la disociación durante 180 segundos. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en la cubeta de lectura de referencia. Aquí, los antígenos se pasaron sobre una superficie con anticuerpo anti-Fab humano inmovilizado, pero en el que se había inyectado HBS-EP en lugar de los anticuerpos.

Interacción con CD19 humano

El anticuerpo anti-Fab humano (Biacore, Friburgo/Alemania) se acopló directamente en un chip CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina estándar (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 8000 UR. Las fusiones Fc del ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido a CD19 o el anticuerpo de control (anti-CD19 (8B8-018) PGLALA huIgG1) se capturaron durante 60 segundos a 20 nM. (kih) de Fc CD19 humano recombinante se pasó a un intervalo de concentración de 7,8 a 500 nM (diluido 2 veces) con un caudal de 30 µL/minuto a través de las cubetas de lectura durante 120 segundos. Se supervisó la disociación durante 120/1800 segundos. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en la cubeta de lectura de referencia. Aquí, los antígenos se pasaron sobre una superficie con anticuerpo anti-Fab humano inmovilizado, pero en el que se había inyectado HBS-EP en lugar de los anticuerpos.

Las constantes cinéticas se derivaron usando el programa informático de evaluación Biacore T200 (vAA, Biacore AB, Uppsala/Suecia), para ajustar las ecuaciones de velocidad para la unión de Langmuir 1:1 por integración numérica.

Las construcciones biespecíficas 3.4, 3.6 y el control D se unen de manera similar a 4-1BB. La **tabla 77** muestra el promedio con desviación estándar (entre paréntesis) de los dos experimentos (usando la solución de captura de construcción a 2 nM o 5 nM). Las construcciones biespecíficas 3.4 y 3.6 se unen a CD19 humano con una afinidad similar a la IgG. Las constantes de afinidad para la interacción se determinaron ajustando a una unión de Langmuir de 1:1. Para las mediciones con 4-1BB hu y 4-1BB cy, se muestran la desviación promedio y estándar (entre paréntesis) (dos experimentos con solución de captura de 2 o 5 nM).

Tabla 77: Unión de la fusión Fc del ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido a CD19 a 4-1BB humano (hu) recombinante, 4-1BB de macaco cangrejero (cy) y CD19 humano (hu).

	Antígeno	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 3.4)	4-1BB hu	7,2E+04 *(5,9E+03)*	2,5E-02 *(1,0E-05)*	3,4E-07 *(2,8E-08)*
	4-1BB cy	1,2E+05 *(8,6E+03)*	1,3E-02 *(1,8E-04)*	1,1E-07 *(9,9E-09)*
	CD19 hu	2,77E+04	2,67E-04	9,64E-09
fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CD19(8B8-018) bivalente (construcción 3.6)	4-1BB hu	6,9E+04 *(1,7E+03)*	2,4E-02 *(1,5E-04)*	3,5E-07 *(1,1E-08)*
	4-1BB cy	1,1E+05 *(7,7E+03)*	1,4E-02 *(3,1E-04)*	1,3E-07 *(1,3E-08)*
	CD19 hu	2,55E+04	2,69E-04	1,06E-08
fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248) humano trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente con cruce de CH-CL y con residuos cargados (control D)	4-1BB hu	7,3E+04 *(3,9E+03)*	2,6E-02 *(6,3E-04)*	3,5E-07 *(1,0E-08)*
	4-1BB cy	1,2E+05 *(1,9E+03)*	1,4E-02 *(1,0E-04)*	1,2E-07 *(2,9E-09)*

anti-CD19(8B8-018) PGLALA huIgG1	CD19 hu	2,12E+04	2,61E-04	1,23E-08

8.2. Resonancia de plasmón superficial (unión simultánea)

La capacidad de unir simultáneamente (kih) de Fc 4-1BB humano y CD19 humano se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se realizaron en un Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de migración (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo/Alemania). Se acopló directamente (kih) de Fc 4-1BB humano biotinilado a una cubeta de lectura de un chip sensor de estreptavidina (SA). Se usaron niveles de inmovilización de hasta 250 unidades de resonancia (UR).

Las construcciones de 4-1BBL dividido trimérico dirigido a CD19 (construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 4.4) se pasaron a un intervalo de concentración de 200 nM con un caudal de 30 µL/minuto a través de las cubetas de lectura durante 90 segundos y la disociación se estableció en cero segundos. Se inyectó CD19 humano como segundo analito con un caudal de 30 µL/minuto a través de las cubetas de lectura durante 90 segundos a una concentración de 500 nM (**figura 34A**). Se supervisó la disociación durante 120 segundos. Las diferencias en el índice de refracción aparente se corrigieron sustrayendo la respuesta obtenida en una cubeta de lectura de referencia, donde no se inmovilizó ninguna proteína.

Como se puede observar en los gráficos de la **figura 35**, todas las construcciones biespecíficas se podrían unir simultáneamente a 4-1BB humano y CD19 humano.

Ejemplo 9

Caracterización funcional de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido a CD-19

9.1. Unión en PMBC humanas activadas de las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen trímeros del ligando 4-1BB dirigido a CD19

Para determinar la unión de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímeros de 4-1BBL a PBMC humanas, se usaron diferentes concentraciones tituladas de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímeros de 4-1BBL dirigido a CD19 en el ensayo como se describe en el ejemplo 5.2.

Las **figuras 36A** y **36B** muestran la unión de las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 como las preparadas en el ejemplo 7 en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ que expresan 4-1BB activados, respectivamente. Las puertas se establecieron en linfocitos T CD45+ CD3+ CD4+ o CD45+ CD3+ CD8+ vivos y la MFI del fragmento F(ab')2 caprino específico del fragmento Fcγ de IgG de anti-IgG humana de AffiniPure conjugado con PE se transfirieron frente a la concentración titulada de variantes de fusión Fc del ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido. La **tabla 78** muestra los valores de EC_{50} como se mide para las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 y moléculas de control.

Tabla 78: Unión a linfocitos T CD4+ activados que expresan 4-1BB y linfocitos T CD8+

Construcción	EC_{50} [nM] $4\text{-}1BB^+CD8^+$	EC_{50} [nM] $4\text{-}1BB^+CD4^+$
Control B	0,05	0,26
Control C	0,02	0,30
Control D	0,04	0,28
Control E	0,13	1,22
3.1	0,03	0,28
3.3	0,01	0,29
3.4	0,15	2,04
3.5	0,04	1,03
3.6	0,05	0,21

9.2 Unión a células tumorales que expresan CD19

Para los ensayos de unión en células tumorales que expresan CD19, se usaron las siguientes líneas celulares de linfoma que expresan CD19: línea celular (B-NHL) de linfoma difuso de linfocitos B grandes no Hodgkin SU-DHL-8 (DSMZ ACC573), línea celular de leucemia linfoide precursora de linfocitos B aguda Nalm6 (DSMZ ACC-128), línea celular de linfoma difuso de linfoblastos de células grandes Toledo (ATCC CRL-2631) y línea celular de

linfoma difuso de linfocitos B grandes OCI-Ly18 (DSMZ ACC-699). Los ensayos se realizaron como se describe para las líneas de células tumorales MV-3 y WM-266-4 que expresan FAP en el ejemplo 5.3.

Se establecieron puertas en células tumorales vivas y se transfirieron MFI de fragmento F(ab')2 caprino específico de fragmento Fcγ de IgG anti-IgG humana de AffiniPure conjugado con PE frente a la concentración titulada de construcciones de fusión Fc de ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido.

La **figura 37A** muestra la unión de las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 como se preparó en el ejemplo 7.1 para difundir la línea celular difusa de linfoma de linfocitos B no Hodgkin (B-NHL) SU-DHL-8 y en la **figura 37B** se presenta la unión de las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 a la línea celular de leucemia linfoide aguda precursora de linfocitos B Nalm6. La **figura 37C** muestra la unión de las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 a la línea celular difusa de linfoma de linfoblastos de células grandes Toledo y la **figura 37D** muestra la unión de las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 a la línea celular difusa de linfoma de linfocitos B grandes OCI-Ly18. La **tabla 79** muestra los valores de EC_{50} como se mide para las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 y las moléculas de control.

Tabla 79: Unión a células tumorales que expresan CD19

Construcción	EC_{50} [nM] SU-DHL-8	EC_{50} [nM] Nalm6	EC_{50} [nM] Toledo	EC_{50} [nM] OCI-Ly18
3.1	0,64	0,43	0,29	0,29
3.3	0,15	0,14	0,10	0,09
3.4	0,31	0,39	0,29	0,26
3.5	0,54	0,43	0,27	0,31
3.6	0,14	0,12	0,09	0,10
control G	0,09	0,10	0,06	0,07

Ejemplo 10

Actividad biológica de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen el trímero del ligando 4-1BB dirigido a CD19

10,1. Activación de NF-κB en células HeLa que expresan 4-1BB humano

Se generaron células HeLa que expresan 4-1BB humano y NF-κB-luciferasa como se describe en el ejemplo 6.1.

Activación de NF-κB en élulas Hela que expresan 4 -1BB humano cocultivadas con células tumorales que expresan CD19

Se cosecharon células humanas 4-1BB HeLa con NF-kB-luciferasa y se resuspendieron en un medio DMEM complementado con 10 % (v/v) de FBS y 1 % (v/v) GlutaMAX-I a una concentración de 0,2 x 10^6 células/ml. 100 µl (2 x 10^4 células) de esta suspensión celular se transfirieron a cada pocillo de una placa de cultivo tisular estéril blanca de 96 pocillos de fondo plano con tapa (greiner bio-one, n.º de cat. 655083) y la placa se incubaron a 37 °C y CO_2 al 5 % durante la noche. Al día siguiente, 50 µl del medio que contiene concentraciones tituladas de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímero de ligando 4-1BB dirigido a CD19 (trímero de fusión 4-1BBL de CD19 dividido) o moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímero de ligando 4-1BB no dirigido a DP47 (Trímero DP47 dividido 4-1BBL). Líneas celulares de linfoma de linfocitos B que expresan CD19 (línea celular grande difusa de linfoma de linfocitos B no Hodgkin (B-NHL) SU-DHL-8 (DSMZ ACC573) y línea celular de linfoma de linfocitos B no Hodgkin humano Pfeiffer (ATCC CRL-2632) se resuspendieron en un medio DMEM suplementado con 10 % (v/v) de FBS y 1 % (v/v) GlutaMAX-I a una concentración de 2 x 10^6 células/ml.

Suspensión celular de linfocitos B de linfoma que expresan CD 19 (50 µl, proporción final 1:5) o sólo medio se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron durante 6 horas a 37 °C y 5 % de CO_2. Se lavaron las células dos veces con 200 µL/pocillo de DPBS. 40 µl de tampón de lisis indicador de reciente preparación (Promega, n.º de cat.: E3971) se añadieron a cada pocillo y las placas se almacenaron durante la noche a -20 °C. Al día siguiente, las placas de células congeladas y el tampón de detección (Luciferase 1000 Assay System, Promega, n.º de cat. E4550) se descongelaron a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µL de tampón de detección a cada pocillo y se midió la actividad de luciferasa lo más rápido posible usando un lector de microplacas SpectraMax M5/M5e y un software SoftMax Pro (Molecular Devices) contando la emisión de luz en URL (unidades de luz liberada por 0,5s/pocillo) o el lector de placas de contador de marcador múltiple Victor3 1420 (Perkin Elmer) y el software de gestión Perkin Elmer 2030 que cuenta la emisión de luz como recuentos por segundo (CPS) y se transfiere frente a la concentración de las construcciones sometidas a prueba.

Moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímero de ligando 4-1BB dirigido a CD19, las construcciones 3.1 y 3.3, desencadenaron la activación de la vía de señalización NF-kB en la línea de células indicadoras en presencia de células de linfoma de linfocitos B que expresan CD19. Por el contrario, las moléculas de control no dirigidas no lograron desencadenar tal efecto en ninguna de las concentraciones probadas (Figura 38).

Ejemplo 11

11.1 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímero de ligando 4-1BB dirigido a CEA (T84.66-LCHA)

11.1.1 Humanización del clon T84.66 anti-CEA

Se desarrollaron nuevas variantes humanizadas del anticuerpo murino T84.66 (Wagener et al., J Immunol 130, 2308 (1983), Neumaier et al., J Immunol 135, 3604 (1985)) mediante injerto de CDRs en las secuencias aceptoras de la región estructural de la línea germinal humana.

Para la humanización de un anticuerpo de origen no humano, se deben trasplantar los residuos de CDR del anticuerpo no humano (donante) a la región estructural de un anticuerpo humano (aceptor). En general, la región estructural aceptora se selecciona alineando la secuencia del donante con una colección de secuencias aceptoras potenciales y eligiendo una que tenga una homología razonable con el donante o que muestre aminoácidos similares en algunas posiciones críticas en cuanto a estructura y actividad. En el presente caso, la búsqueda de la región aceptora del anticuerpo se realizó alineando la proteína T84.66 de ratón (NCBI Acc No: CAA36980 para la cadena pesada (SEQ ID NO: 317), y CAA36979 (SEQ ID NO: 318) para la cadena ligera) secuencia de una colección de secuencias de la línea germinal humana y seleccionando esa secuencia humana que mostró una alta identidad de secuencias. Aquí, la secuencia IGHV1-69* 08 de la base de datos IMGT se eligió como la secuencia aceptora de la región estructural de la cadena pesada (IMGT Acc No. Z14309, SEQ ID NO: 319), y la secuencia IGKV3-11* 01 (IMGT Acc No. X01668, SEQ ID NO: 320) se eligió como aceptor de la región estructural para la cadena ligera. En estas dos regiones estructurales aceptoras, se injertaron las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los dominios variables pesado y ligero del ratón. Dado que la región estructural 4 (FR4) no forma parte de la región variable del gen de la línea germinal V, la alineación para esta posición se realizó individualmente. La secuencia JH4 se eligió para la cadena pesada y la secuencia JK2 se eligió para la cadena ligera.

11.1.2 Unión de diferentes variantes humanizadas de IgG T84.66 a las células

La unión de diferentes variantes humanizadas de T84.66 IgG se probó en células de adenocarcinoma gástrico humano que expresan CEA (MKN45, DSMZ ACC409).

En resumen, las células se cosecharon, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2 x 10^6 células/ml en tampón FACS (100 µl de PBS, BSA al 0,1 %). Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,2 x 10^6 células) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 minutos a 4 °C con concentraciones crecientes del CEA (4 ng/ml - 60 µg/ml), se lavaron dos veces con PBS frío, BSA al 0,1 %, se reincubaron durante otros 30 minutos a 4 °C con anticuerpo secundario específico del fragmento Fcg anti-IgG humana caprino del fragmento F(ab')2 de AffiniPure conjugado con PE (Jackson Immuno Research Lab PE # 109-116-170), se lavaron dos veces con PBS frío, BSA al 0,1 % y se analizaron de inmediato por FACS usando un FACS CantoII (programa informático FACS Diva). Las curvas de unión y los valores de EC50 se obtuvieron y calcularon usando GraphPadPrism5.

La **figura 39** muestra el patrón de unión diferente de variantes humanizadas seleccionadas de la IgG T84.66 a CEA humano, expresado en células MKN45. Basándose en los valores de unión de EC50 calculados (**Tabla 80**), se seleccionó la variante humanizada 1 para una evaluación adicional.

Tabla 80: Unión de diferentes variantes humanizadas de IgG T84.66 a las células (valores de CE50, basados en las curvas de unión mostradas en la Figura 39, calculadas por Graph Pad Prism).

	EC50 (µg/ml)
T84.66 quimérico original	0,99
Variante humanizada 1	1,5
Variante humanizada 2	8,6
Variante humanizada 3	1,4
Variante humanizada 4	3,1

Variante humanizada 5	-
Variante humanizada 6	-

La variante humanizada 1 se denomina a continuación T84.66-LCHA. Las secuencias de aminoácidos de sus CDRs y de VH y VL así como las secuencias de aminoácidos del dominio VH y VL del clon quimérico original T84.66 se muestran en la Tabla 81.

Tabla 81: Secuencias de aminoácidos de los dominios variables del clon T84.66-LCHA de CEA y su anticuerpo original T84.66

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO:
CDR-H1 CEA	DTYMH	321
CDR-H2 CEA	RIDPANGNSKYVPKFQG	322
CDR-H3 CEA	FGYYVSDYAMAY	323
CDR-L1 CEA	RAGESVDIFGVGFLH	324
CDR-L2 CEA	RASNRAT	325
CDR-L3 CEA	QQTNEDPYT	326
VH de aglutinante de CEA original	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQ GLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGKATITADTSSNTAYLQLTSLTS EDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTSVTVSS	327
VL de aglutinante de CEA original	DIVLTQSPASLAVSLGQRATMSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKP GQPPKLLIYRASNLESGIPVRFSGTGSRTDFTLIIDPVEADDVATY YCQQTNEDPYTFGGGTKLEIK	328
VH de CEA (T84.66-LCHA) de aglutinante de CEA humanizado	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSS	329
VL de CEA (T84.66-LCHA) de aglutinante de CEA humanizado	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPG QAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQTNEDPYTFGQGTKLEIK	330

11.2 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímero de ligando 4-1BB dirigido a CEA (T84.66-LCHA)

Se sintetizaron diferentes fragmentos de la secuencia de ADN que codifica parte del ectodominio (aminoácidos 71-254 y 71-248) del ligando 4-1BB humano de acuerdo con la secuencia P41273 de la base de datos Uniprot (SEQ ID NO: 42).

11.2.1 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímero de ligando 4-1BB (71-254) dirigido a CEA monovalente (T84.66-LCHA) con dominios CH1-CL cruzados con residuos cargados (construcción 5.1)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-254), separados por conectores (G4S)2 y fusionado al dominio IgG1-CL humano, como se representa en la **figura 29A**: ligando 4-1BB humano, conector(G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CL humano. Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-254) y fusionado al dominio IgG1-CH humano, como se describe en la Figura 29B: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CH humano.

Para mejorar el emparejamiento correcto, se han introducido las siguientes mutaciones en el CH-CL cruzado. En el ligando dimérico 4-1BB fusionado con CL, E123R y Q124K humanos. En el ligando monomérico 4-1BB fusionado con CH1, K147E y K213E humanos.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para CEA, clon T84.66-LCHA, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido 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.

La combinación de la cadena de botón de ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal anti-CEA-Fc dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CEA permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y una Fab de unión a CEA (**figura 40**, construcción 5.1).

La **tabla 82** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CEA monovalente (T84.66-LCHA) con CH-CL cruzado y residuos cargados (construcción 5.1).

Tabla 82: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CEA monovalente (T84.66-LCHA) que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 5.1). * para residuos cargados

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
129	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
130	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
331	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAA ACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCG GCTTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCC AGGCCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATC GACCCCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTT CCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCT CCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCCCTTCGGCTACTAC GTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCAC ACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTC CGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCG GCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCC CTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG AGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTG CCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCC CACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGG CGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGC GCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA

		GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAAA
332	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CEA(T84.66-LCHA)	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCACCCTGTCACTG TCTCCAGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGTAGAGCCGG CGAGAGCGTGGACATCTTCGGCGTGGGATTTCTGCACTG GTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCAGACTGCTGA TCTACAGAGCCAGCAACCGGGCCACAGGCATCCCCGCC AGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTG ACAATCAGCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTA CTACTGCCAGCAGACCAACGAGGACCCCTACACCTTTGG CCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT GAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG CAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG T
115	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
116	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
333	anti-CEA (T84.66 - LCHA) cadena de ojal Fc	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQ APGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN W YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
334	cadena ligera anti-CEA (T84.66-LCHA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQ QKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

11.2.2 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene el trímero del ligando 4-1BB (71-254) dirigido a CEA monovalente (T84.66-LCHA) con dominios CH1-CL cruzados sin residuos cargados (construcción 5.2)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-254), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el dominio de IgG1-CL humano, de forma similar a como se representa en la figura (29A), pero sin mutaciones aminoacídicas en el dominio CL: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CL humano. Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-254) y se fusionó con el dominio de IgG1-CH1 humano, de forma similar a como se representa en la figura (29B), pero sin mutaciones aminoacídicas en el dominio CH1: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CH1 humano.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para CEA, clon T84.66-LCHA, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o con la cadena ligera constante de IgG1 humana.

Se han introducido 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. La combinación de la cadena de botón de ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal anti-CEA-Fc dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CEA permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y una Fab de - unión a CEA (**figura 40**, construcción 5.2).

La **tabla 83** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión al antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CEA monovalente (T84.66-LCHA) que contiene cruce de CH-CL cruzado sin residuos cargados (construcción 5.2).

Tabla 83: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CEA monovalente (T84.66-LCHA) que contiene cruce de CH-CL sin residuos cargados (construcción 5.2)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
165	Secuencia de nucleótidos, ligando dimérico (71-254) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 22
166	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1	véase la tabla 22
331	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 82
332	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 82
117	Ligando dimérico (71-254) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 22
118	Ligando monomérico (71-254) - CH1	véase la tabla 22
333	Cadena de ojal Fc anti-CEA (T84.66-LCHA)	véase la tabla 82
334	cadena ligera anti-CEA (T84.66-LCHA)	véase la tabla 82

11.2.3 Preparación de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene el trímero de ligando 4-1BB (71-254) dirigido a CEA bivalente (T84.66-LCHA) (construcción 5.3)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-254), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el extremo C de la cadena de ojal Fc de IgG1 humana, como se representa en la figura 29C: ojal Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano. Un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-254) se fusionó con el extremo C de la cadena de botón Fc de IgG1 humana como se describe en la figura 29D: botón Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de las cadenas pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para CEA, clon T84.66- LCHA, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido 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. La combinación de la cadena pesada del ligando dimérico del ojal anti-CEA huIgG1 que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena pesada del ligando monomérico del botón anti-CEA huIgG1 que contiene las mutaciones S354C/T366W y las cadenas ligeras anti-CEA permitió la generación de un heterodímero, que incluía un ligando de 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fab de unión a CEA (figura 40, construcción 5.3).

La **tabla 84** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CEA bivalente (T84.66-LCHA) (construcción 5.3).

Tabla 84: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de PGLALA (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido de CEA bivalente (T84.66-LCHA) (construcción 5.3)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
335	Secuencia de nucleótidos, cadena de 4-1BBL dimérico (71-254) de ojal Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAA ACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCG GCTTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCC AGGCCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATC GACCCCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTT CCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCT CCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCCCTTCGGCTACTAC GTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCAC ACTCGTGACCGTGTCCTCT*GCTAGCACCAAGGGCCCCTCC* *GTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCG* *GCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC* *CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACC* *TCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTG* *GCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGC* *AGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA* *GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAG* *AGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACC* *TGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA* *AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC* *ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG* *TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT* *GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT* *ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG* *GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG* *CCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA* *GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCAT* *CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTG* *CGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT* *GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC* *GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGA* *GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA* *CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC* *ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGG* *CGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGA* *GCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGG* *CAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCT* *GATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTG* *GCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGG* *ACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTA* *CGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGC* *GAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCC* *TCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACA* *GTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCG*

		CATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGC CAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTA GACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGG CCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTT CTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCAGC CGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCAGCTG GTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTG GTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGG GGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGC TAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAG GCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTG GCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAG CTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGC GAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGC TGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCA TACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAG GGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGAT CCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
336	Secuencia de nucleótidos, 41- BBL monomérico (71-254) de botón Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAA ACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCG GCTTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCC AGGCCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATC GACCCCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTT CCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCT CCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCCCTTCGGCTACTAC GTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCAC ACTCGTGACCGTGTCCTCT*GCTAGCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAG GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT CTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG

		CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAA ACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCG GCTTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCC AGGCCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATC GACCCCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTT CCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCT CCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCCCTTCGGCTACTAC GTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCAC ACTCGTGACCGTGTCCTCT*GCTAGCACCAAGGGCCCATCG* *GTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG* *GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC* *CGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACC* *AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAG* *GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC* *AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA* *GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT* *CTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT* *GAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA* *ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA* *CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT* *CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG* *CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA* *CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG* *CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC* *CCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG* *GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTG* *CAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTC* *TGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTG* *GGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACC* *CCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTC* *CAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAAC* *GTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC* *ACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGG* *CGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGA* *GCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGG* *CAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCT* *GATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTG* *GCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGG*
		ACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTA *CGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGC* *GAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCC* *TCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACA* *GTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCG* *CATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGC* *CAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTA* *GACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGG* *CCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTT* *CTCCAAGAAGCGAA*
332	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CEA(T84.66-	véase la tabla 82

	LCHA)	
337	cadena de 41-BBL dimérico (71-254) de ojal Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQ APGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLV TVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGG SREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDT KELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE*
338	cadena de 4-1BBL (71-254) monomérico de botón Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQ APGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLV TVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGG SREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLPSPRSE*
334	cadena ligera anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 82

11.2.4 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímero de ligando 4-1BB (71-248) dirigido a CEA monovalente (T84.66-LCHA) con dominios CH1-CL cruzados con residuos cargados (construcción 5.4)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-248), separados por conectores (G4S) 2, y fusionados con el dominio IgG1-CL humano, de forma análoga al representado en la figura 29A: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CL humano. Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-248) y fusionado al dominio IgG1-CH humano, de forma análoga al descrito en la Figura 29B: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, humano CH.

Se subclonó el polipéptido que codifica el ligando dimérico de 4-1BB fusionado al dominio CL humano sin cambio de pauta de lectura con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant, Zhu et al. 1998). Para mejorar el emparejamiento correcto, se han introducido las siguientes mutaciones en el CH-CL cruzado. En el ligando dimérico 4-1BB fusionado con CL, E123R y Q124K humanos. En el ligando monomérico 4-1BB fusionado con CH1, K147E y K213E humanos.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para CEA, clon T84.66-LCHA, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas pesadas de botón y 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 botón ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal Fc anti-CD19 dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y una Fab de unión a CEA (**figura 40**, contrucción 5.4).

La **tabla 85** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CEA monovalente (T84.66-LCHA) con CH-CL cruzado y residuos cargados (construcción 5.4).

Tabla 85: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CEA monovalente (T84.66-LCHA) que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 5.4). * residuos cargados

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
169	Secuencia de nucleótidos, ligando dimérico (71-248) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 24
170	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1*	véase la tabla 24
331	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 82
332	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 82
119	Ligando dimérico (71-248) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 24
120	Ligando monomérico (71-248) - CH1*	véase la tabla 24
333	cadena de ojal Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 62
334	cadena ligera anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 59

11.2.5 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímero de ligando 4-1BB (71-248) dirigido a CEA monovalente (T84.66-LCHA) con dominios CH1-CL cruzados sin residuos cargados (construcción 5.5)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-248), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el dominio de IgG1-CL humano, de forma similar a como se representa en la figura (29A), pero sin mutaciones aminoacídicas en el dominio CL: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CL humano. Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-248) y se fusionó con el dominio de IgG1-CH1 humano, de forma similar a como se representa en la figura (29B), pero sin mutaciones aminoacídicas en el dominio CH1: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CH1 humano.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para CEA, clon T84.66-LCHA, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido 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. La combinación de la cadena de botón de ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal anti-CEA-Fc dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CEA permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y una Fab de unión a CD19 (figura 40, construcción 5.5).

La **tabla 86** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión al antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CEA monovalente (T84.66-LCHA) que contiene cruce de CH-CL cruzado sin residuos cargados (construcción 5.5).

Tabla 86: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CEA monovalente (T84.66-LCHA) que contiene cruce de CH-CL sin residuos cargados (construcción 5.5).

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
171	Secuencia de nucleótidos, ligando dimérico (71-248) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 25
172	Secuencia de nucleótidos, ligando monomérico (71-248) - CH1	véase la tabla 25
331	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 82
332	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 82
173	Ligando dimérico (71-248) - CL cadena de botón Fc	véase la tabla 25
174	Ligando monomérico (71-248) - CH1	véase la tabla 25
333	cadena de ojal Fc anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 82
334	cadena ligera anti-CEA(T84.66-LCHA)	véase la tabla 82

11.2.6 Preparación de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene el trímero de ligando 4-1BB (71-248) dirigido a CEA bivalente (T84.66-LCHA) (construcción 5.6)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-248), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el extremo C de la cadena de ojal Fc de IgG1 humana, como se representa en la **Figura 29C**: ojal Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano. Un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-254) se fusionó con el extremo C de la cadena de botón Fc de IgG1 humana como se describe en la **figura 29D**: botón Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de las cadenas pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para CEA, clon T84.66- LCHA, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido 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. La combinación de la cadena pesada del ligando dimérico del ojal anti-CEA huIgG1 que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena pesada del ligando monomérico del botón anti-CEA huIgG1 que contiene las mutaciones S354C/T366W y las cadenas ligeras anti-CEA permitió la generación de un heterodímero, que incluía un ligando de 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fab de unión a CEA (figura 40, construcción 5.6).

La **tabla 87** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CEA(T84.66-LCHA) bivalente (construcción 5.6).

Tabla 87: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CEA (T84.66-LCHA) bivalente (construcción 5.6)

339	Secuencia de nucleótidos, cadena de 4-1BBL dimérico (71-248) de ojal Fc anti-CEA (T84.66-LCHA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAA ACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCG GCTTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCC AGGCCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATC GACCCCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTT CCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCT CCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCCCTTCGGCTACTAC GTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCAC ACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTC CGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCG GCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCC CTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG AGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTG CCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCC CACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGG

		CGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGC GCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCA GAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTG GCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGG TACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGC GGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGT GGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGA ACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTG TGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTG CTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTC CTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTC AAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGC CTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTT CAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCG GCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAG CTGTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGA CAGGGCATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTG CTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGG CTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAA GAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGT GTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGT GGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCA TCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACT GGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGC CAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGC ATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCAT ACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCA GGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGA GATCCCAGCCGGGCTC
340	Secuencia de nucleótidos, cadena de 4-1BBL monomérico (71-248) de botón Fc anti-CEA (T84.66-LCHA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAA ACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCG GCTTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCC AGGCCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATC GACCCCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTT CCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCT CCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCCCTTCGGCTACTAC GTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCAC ACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG

		CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGA TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCA GAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGT CTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGAC CACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCT GTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGC AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC CTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAG CCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCC AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCT GCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
332	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CEA (T84.66-LCHA)	véase la tabla 82
341	cadena de 4-1BBL dimérico (71-248) de ojal Fc anti-CEA (T84.66-LCHA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQ APGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE

		DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPA GLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
342	cadena de 4-1BB monomérico (71-248) de botón Fc anti-CEA (T84.66-LCHA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQ APGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPA GL
334	cadena ligera anti-CD19(8B8-018)	véase la tabla 82

11.2.7 Preparación de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímeros de ligando 4-1BB (71-254) dirigido a CEA (T84.66) monovalente con dominios CH1-CL cruzados con residuos cargados (construcción 5.7)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-254), separados por conectores (G4S)2 y fusionado con el dominio de IgG1-CL humano, como se representa en la figura 29A: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CL humano. Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-254) y se fusionó con el dominio IgG1- CH humano, como se representa en la figura 29B: ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, CH humano.

Para mejorar el emparejamiento correcto, se han introducido las siguientes mutaciones en el CH-CL cruzado. En el ligando dimérico 4-1BB fusionado con CL, E123R y Q124K humanos. En el ligando monomérico 4-1BB fusionado con CH1, K147E y K213E humanos.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican una proteína de unión específica para CEA, clon T84.66, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido 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.

La combinación de la cadena de botón de ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal Fc anti-CD19 dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y una Fab de unión a CEA. La construcción 5.7 corresponde a la construcción 5.1 como se muestra en la **figura 40.**

La **tabla 88** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigidido a CEA(T84.66) monovalente con CH-CL cruzado y residuos cargados (construcción 5.7).

Tabla 88: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CEA(T84.66) monovalente que contiene CH-CL cruzado con residuos cargados (construcción 5.7). * para residuos cargados

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
129	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
130	Secuencia de nucleótidos, 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
343	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-CEA(T84.66)	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAACTGGTGGA ACCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGAGCTGTACCGCCAGCGG CTTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTCAAGC AGCGGCCTGAGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAGAATC GACCCCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTT CCAGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCAGCAGCA ACACAGCCTACCTGCAGCTGACCAGCCTGACCTCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCCCTTCGGCTACTAC GTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCAC AAGCGTGACCGTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTC CGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCG GCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCC CTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG AGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTG CCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCC
		CACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGG CGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGC GCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAAA

344	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CEA(T84.66)	GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCTCTCTGGCCGTG TCTCTGGGACAGAGGGCCACCATGTCTTGCAGAGCCGG CGAGAGCGTGGACATCTTCGGCGTGGGATTTCTGCACTG GTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCCAAGCTGCTGA TCTACAGAGCCAGCAACCTGGAAAGCGGCATCCCCGTG CGGTTTAGCGGCACCGGCAGCAGAACCGACTTCACCCT GATCATCGACCCCGTGGAAGCCGACGACGTGGCCACCT ACTACTGCCAGCAGACCAACGAGGACCCCTACACCTTTG GCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCT GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG TTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC AGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
115	4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón Fc	véase la tabla 3
116	4-1BBL hu monomérico (71-254) - CH1*	véase la tabla 3
345	Cadena de ojal Fc anti-CEA (T84.66)	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQ RPEQGLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGKATITADTSSNTAY LQLTSLTSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDE
		LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
346	cadena ligera anti-CEA (T84.66)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATMSCRAGESVDIFGVGFLHWY QQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPVRFSGTGSRTDFTLIIDPVE ADDVATYYCQQTNEDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

11.2.8 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contiene trímero de ligando 4-1BB (71-254) dirigido a CEA (T84.66) bivalente (construcción 5.8)

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando 4-1BB (71-254), separado por conectores (G4S)2 y fusionado con el extremo C de la cadena de ojal Fc de IgG1 humana, como se representa en la figura 29C: ojal Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano. Un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando 4-1BB (71-254) se fusionó con el extremo C de la cadena de botón Fc de IgG1 humana como se describe en la figura 29D: botón Fc de IgG1 humana, conector (G4S)2, ligando 4-1BB humano.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican un aglutinante específico para CEA, clon T84.66, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido 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. La combinación de la cadena del ligando dimérico del ojal anti-CEA huIgG1 que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena del

ligando monomérico del botón anti-CEA huIgG1 que contiene las mutaciones S354C/T366W y la cadena ligera anti-CEA permitió la generación de un heterodímero, que incluía un ligando de 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fab de unión a CEA. La construcción 5.8 corresponde a la construcción 5.3 como se muestra en la **figura 40.**

La **tabla 89** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CEA(T84.66) bivalente (construcción 5.8).

Tabla 89: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de PGLALA (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CEA(T84.66) bivalente (construcción 5.8)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
347	Secuencia de nucleótidos, cadena de 4-1BBL dimérico (71-254) de ojal Fc anti-CEA(T84.66)	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAACTGGTGGA ACCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGAGCTGTACCGCCAGCGG CTTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTCAAGC AGCGGCCTGAGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAGAATC GACCCCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTT CCAGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCAGCAGCA ACACAGCCTACCTGCAGCTGACCAGCCTGACCTCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCCCTTCGGCTACTAC GTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCAC AAGCGTGACCGTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTC CGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCG GCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCC CTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG AGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTG CCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCC CACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGG CGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGC GCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCA GAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTG

		TCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCT GCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTG CCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGG GTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGC GCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGG CATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGG ACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTGCC AAGCCCTAGATCAGAA
348	Secuencia de nucleótidos, cadena de 4-1BBL monomérico (72-254) de botón Fc anti-CEA(T84.66)	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAACTGGTGGA ACCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGAGCTGTACCGCCAGCGG CTTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTCAAGC AGCGGCCTGAGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAGAATC GACCCCGCCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTT CCAGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCAGCAGCA ACACAGCCTACCTGCAGCTGACCAGCCTGACCTCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCCCTTCGGCTACTAC GTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGGGCAC AAGCGTGACCGTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGA TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCA GAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGT CTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGAC CACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCT GTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGC AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC CTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAG CCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCC AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT

		CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAA
344	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-CEA(T84.66)	véase la tabla 88
349	cadena de 4-1BBL dimérico (71-254) de ojal Fc anti-CEA(T84.66)	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQ RPEQGLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGKATITADTSSNTAY LQLTSLTSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDE LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDT KELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQ RLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLV AQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
350	cadena de 4-1BBL (71-254) monomérico de botón Fc anti-CEA(T84.66)	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQ RPEQGLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGKATITADTSSNTAY LQLTSLTSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDT KELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQ RLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSE
346	cadena ligera anti-CEA(T84.66)	véase la tabla 88

11.3 Preparación de las moléculas de fusión Fc del ligando 4-1BB trimérico dividido no dirigido e IgG humana como moléculas de control

11.3. 1 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB humano no dirigido (moléculas de control)

Estas moléculas de control se prepararon como se describe anteriormente para la construcción 3.1 dirigida a CEA

(denominado control B), 3.3 (denominado control C), 3.4 (denominado control D) y 3.5 (denominado control E) con la única diferencia de que el aglutinante anti-CD19 (VH-VL) se reemplazó por un control de línea germinal, denominado DP47, que no se une al antígeno (véase la figura 40). Las secuencias de ADNc y de aminoácidos del control B, la fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-254) trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente que contiene CH-CL cruzado con residuos cargados, se muestran en la **tabla 68** anterior (véase el ejemplo 7.3.1). La **tabla 69** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) trimérico dividido no dirigido a DP47 bivalente, control C. La **tabla 70** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión (kih) de Fc ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados, control D. La **tabla 71** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión (kih) de Fcl ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente sin residuos cargados en el cruce de CH-CL, control E.

11.3.2 Anticuerpos como moléculas de control

Un control adicional usado en los ensayos, denominado control F, fue un DP47 no dirigido, control de la línea germinal, IgG1 humana, que contenía las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala, para anular la unión a los receptores Fc gamma. Las secuencias de ADNc y de aminoácidos del control F se pueden encontrar en la **tabla 73** anterior.

11.4 Producción de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc del ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido a CEA y sus moléculas de control

Las secuencias codificantes de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido dirigido y no dirigido se clonaron en un vector plásmido, que dirige la expresión del inserto a partir de un promotor MPSV y contiene una secuencia poliA sintética localizada en el extremo 3' del CDS. Además, el vector contiene una secuencia de EBV OriP para el mantenimiento episomal del plásmido.

Se produjo la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamífero usando polietilenimina. Se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión. Para las variantes 1, 2, 4, 5 y su control B, D y E, en una proporción de 1:1:1:1 ("vector ligando dimérico-CL-cadena de botón": "vector fusión de ligando monomérico-CH1": "vector Fab anti-CEA-cadena de ojal": "vector cadena ligera anti-CEA"). Para la variante 3, 6 y su control C, a una proporción de 1:1:1 ("vector cadena de ligando dimérico de ojal Fc de huIgG1": "vector cadena de ligando monomérico de botón Fc de huIgG1": "vector cadena ligera anti-CEA"). Las IgG humanas, usadas como control en el ensayo, se produjeron como para la construcción biespecífica (para la transfección solo se usó un vector para la cadena ligera y un vector para la cadena pesada en una proporción de 1:1).

Para la producción en matraces de agitación de 500 mL, se sembraron 300 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, se centrifugaron las células durante 10 minutos a 210 x g y se reemplazó el sobrenadante por 20 mL de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión (200 µg de ADN total) se mezclaron en 20 mL de medio CD CHO. Después de la adición de 540 µL de PEI, la solución se agitó en vórtex durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, se mezclaron las células con la solución ADN/PEI, se transfirieron a un matraz de agitación de 500 mL y se incubó durante 3 horas a 37°C en una incubadora con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 160 mL de medio Excell suplementado con L-glutamina 6mM, 5g/L de PEPSOY y ácido valproico 1,2 mM y se cultivaron las células durante 24 horas. Un día después de la transfección se añadió Feed al 12 % (aminoácidos y glucosa). Después de cultivarse durante 7 días, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación durante 30-40 minutos al menos 400 x g. La solución se filtró en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm), se suplementó con acida sódica hasta una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantuvo en 4 °C.

La fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido, así como la IgG, se purificó a partir de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando la proteína A, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, se cargó el sobrenadante en una columna MabSelect Sure (CV = 5-15 mL, resina de GE Healthcare) equilibrado con fosfato de sodio (20 mM), tampón de citrato de sodio (20 mM) (pH 7,5). La proteína no unida se eliminó lavando con al menos 6 volúmenes de columna del mismo tampón. La proteína unida se eluyó usando un gradiente lineal (20 CV) o una elución escalonada (8 CV) con citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, tampón de glicina 100 mM (pH 3,0). Para el gradiente lineal, se aplicó una elución escalonada adicional de 4 volúmenes de columna.

El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/10 (v/v) de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0. La proteína se concentró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, solución Tween20 al 0,01 % (v/v) de pH 6,0.

Se determinó la concentración de proteína midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando un coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos. La pureza y el peso molecular de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dirigido se analizaron mediante SDS-PAGE en

presencia y ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con Coomassie SimpleBlue™ SafeStain (Invitrogen USA) o CE-SDS usando Caliper LabChip GXII (Perkin Elmer). Se analizó el contenido de agregado de las muestras usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) en K2HPO4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN3 al 0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7 a 25 °C.

La **tabla 90** resume el rendimiento y el contenido final de monómero de las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido dirigido a CEA.

Tabla 90: Análisis bioquímico de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido dirigido a CEA.

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
fusión Fc del ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CEA(T84.66-LCHA) monovalente que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 5.4)	98	1,4
fusión Fc de ligando 4-1BB (71-248) trimérico dividido dirigido a CEA(T84.66-LCHA) bivalente (construcción 5.6)	98	0,4
fusión Fc del ligando 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CEA(T84.66) monovalente que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 5.7)	97	15
fusión Fc de ligando 4-1BB (71-254) trimérico dividido dirigido a CEA(T84.66) bivalente (construcción 5.8)	96	2

La **tabla 91** resume el rendimiento y el contenido final de monómero de las moléculas de fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido no dirigido a DP47, tanto monovalente (control B, D y E) como bivalente (control C), y de PGLALA de IgG1 humana línea germinal DP47 (control F).

Tabla 91: Análisis bioquímico de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido no dirigido a DP47

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) humano trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente (control B)	99	15,4
fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) humano trimérico dividido no dirigido a DP47 bivalente (control C)	98	12,6
fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) humano trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente (control D)	99,5	25,9
fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB (71-254) humano trimérico dividido no dirigido a DP47 monovalente (control E)	93,3	4,1
línea germinal DP47 PGLALA de IgG1 humana	100	50

Ejemplo 12

Caracterización funcional de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido a CEA

12.1 Resonancia de plasmón superficial (unión simultánea)

Producción de hu NA3B3 A2 como antígeno para construcciones de 4-1BBL dividido trimérico dirigido a CEA

El antígeno usado para evaluar la unión de SPR a CEA era una molécula híbrida compuesta por dominios A3 y B3 de CEACAM5 humano (CEA) y dominios N y A2 de CEACAM1 humano (BGP1) de forma similar a lo que se ha descrito para NABA (Durbin H. et al, Proc Natl Acad Sci USA. mayo de 1994 10:91(10):4313-7). El antígeno se denomina aquí NA3B3A2 y se puede encontrar una descripción esquemática en la **figura 41A.**

La **tabla 92** muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de hu NA3B3A2-avi-His.

351	Secuencia de nucleótidos, NA3B3A2 hu-avi His	CAGCTGACCACCGAGTCCATGCCCTTCAACGTGGCCG AGGGCAAAGAGGTGCTGCTGCTGGTCCACAACCTGCC CCAGCAGCTGTTCGGCTACAGCTGGTACAAGGGCGAG CGGGTGGACGGCAACCGGCAGATCGTGGGCTACGCCA TCGGCACCCAGCAGGCCACACCCGGCCCTGCCAATAG CGGCAGAGAGACAATCTACCCCAACGCCAGCCTGCTG ATCCAGAACGTGACCCAGAACGACACCGGCTTCTACA CACTCCAAGTCATCAAGAGCGACCTGGTCAACGAGGA AGCCACCGGCCAGTTCCACGTGTACCCCGAGCTGCCC AAGCCCAGCATCAGCAGCAACAACAGCAAGCCCGTGG AAGATAAGGACGCCGTGGCCTTTACCTGCGAGCCCGA GGCCCAGAACACCACCTACCTGTGGTGGGTCAACGGC CAGAGCCTGCCCGTGTCCCCCAGACTCCAGCTGAGCA ACGGCAACAGAACCCTGACCCTGTTCAACGTGACCCG GAATGACGCCAGAGCCTACGTGTGCGGCATCCAGAAC AGCGTGTCCGCCAACCGCAGCGACCCCGTGACCCTGG ATGTGCTGTACGGCCCCGACACCCCCATCATCAGCCCC CCTGACAGCAGCTACCTGAGCGGCGCCAACCTGAACC TGAGCTGCCACAGCGCCAGCAACCCCAGCCCTCAGTA CAGCTGGCGGATCAACGGCATCCCCCAGCAGCACACC CAGGTGCTGTTTATCGCCAAGATCACCCCCAACAACA ACGGCACCTACGCCTGCTTCGTGTCCAACCTGGCCACC GGCCGGAACAACAGCATCGTGAAGTCCATCACCGTGT CCGCCTCCCTGAGCCCCGTGGTGGCCAAGCCTCAGAT CAAGGCCAGCAAGACCACCGTGACCGGCGACAAGGA CAGCGTGAACCTGACCTGCTCCACCAACGATACCGGC ATCAGCATCCGGTGGTTCTTCAAGAATCAGTCCCTGCC CAGCAGCGAGCGGATGAAGCTGAGCCAGGGCAACAT CACCCTGTCCATCAACCCCGTGAAAAGAGAGGACGCC GGCACCTATTGGTGCGAGGTGTTCAACCCCATCAGCA AGAACCAGAGCGACCCCATCATGCTGAACGTGAACTA CAACGCCCTGCCCCAAGAAAACCTGATCAATGTTGAT CTGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCCAGGCAGCGGCCTGA ACGACATCTTCGAAGCCCAGAAAATCGAGTGGCACGA GGCCAGAGCCCACCACCACCATCACCAC
352	NA3B3A2-avi-His humano	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGER VDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNV TQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSN NSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSPR LQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPV TLDVLYGPDTPIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYS WRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRN NSIVKSITVSASLSPVVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNLTC STNDTGISIRWFFKNQSLPSSERMKLSQGNITLSINPVKRE DAGTYWCEVFNPISKNQSDPIMLNVNYNALPQENLINVD LEVLFQGPGSGLNDIFEAQKIEWHEARAHHHHHH

La producción de proteínas se realizó como se describe anteriormente para la proteína de fusión Fc (ejemplo 7.1.1). Las proteínas secretadas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares mediante cromatografía quelante, seguida de cromatografía de exclusión por tamaño. La primera etapa cromatográfica se realizó en un cartucho NiNTA Superflow (5 ml, Qiagen) equilibrado en fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 nM, pH 7,4. La elución se realizó aplicando un gradiente sobre un volumen de 12 columnas desde el 5% al 45% de tampón de elución (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 nM, imidazol 500 mM, pH 7,4).

La proteína se concentró y filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 75 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, NaCl 140 mM, Tween-20 al 0,01 % pH 6,0. La **tabla 93** resume el rendimiento y el

contenido de monómero final de NA3B3A2-avi-His humano.

Tabla 93: Análisis bioquímico de NA3B3A2-avi-His humano

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
NA3B3A2-avi-His humano	88	14,1

La capacidad de unir simultáneamente (kih) de Fc 4-1BB humano y NA3B3A2 humano se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se realizaron en un Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de migración (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo/Alemania). Se acopló directamente (kih) de Fc 4-1BB humano biotinilado a una cubeta de lectura de un chip sensor de estreptavidina (SA). Se usaron niveles de inmovilización de hasta 250 unidades de resonancia (UR).

Las construcciones de 4-1BBL dividido trimérico dirigido a CEA (construcciones 5.4, 5.6, 5.7 y 5.8) se pasaron a un intervalo de concentración de 200 nM con un caudal de 30 µL/minuto a través de las cubetas de lectura durante 90 segundos y la disociación se estableció en cero segundos. Se inyectó NA3B3A2 humano como segundo analito con un caudal de 30 µL/minuto a través de las cubetas de lectura durante 90 segundos a una concentración de 500 nM **(figura 41B)**. Se supervisó la disociación durante 120 segundos. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en una cubeta de lectura de referencia.

Como se puede observar en los gráficos de la **figura 42**, todas las construcciones biespecíficas se podrían unir simultáneamente a 4-1BB humano y NA3B3A2 humano.

12.2. Unión en PMBC humanas activadas de las moléculas de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc que contienen trímeros del ligando 4-1BB dirigido a CEA

Para determinar la unión de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímeros de 4-1BBL a PBMC humanas, se usaron diferentes concentraciones tituladas de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímeros de 4-1BBL dirigido a CEA en el ensayo como se describe en el ejemplo 5.2.

La **figuras 43** muestra la unión de las construcciones 5.4, 5.6, 5.7 y 5.8 como las preparadas en el ejemplo 11 en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ que expresan 4-1BB activados, respectivamente. Las puertas se establecieron en linfocitos T CD45+ CD3+ CD4+ o CD45+ CD3+ CD8+ vivos y la MFI del fragmento F(ab')2 caprino específico del fragmento Fc*γ* de IgG de anti-IgG humana de AffiniPure conjugado con PE se transfirieron frente a la concentración titulada de variantes de fusión Fc del ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido.

La **tabla 94** muestra los valores de EC_{50} como se mide para las construcciones 5.4, 5.6, 5.7 y 5.8 y las moléculas de control.

Tabla 94: Unión a linfocitos T CD4+ activados que expresan 4-1BB y linfocitos T CD8+

Construcción	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD8$^+$	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD4$^+$
Control B	0,05	0,26
Control C	0,02	0,30
Control D	0,04	0,28
Control E	0,13	1,22
5.4	0,13	0,35
5.6	0,06	0,34
5.7	0.0004	0,36
5.8	0,17	0,38

12.2 Unión a células tumorales que expresan CEA

Para ensayos de unión en células tumorales que expresan CEA, se usaron las siguientes líneas celulares de linfoma que expresan CEA humano: líneas celulares tumorales que expresan CEA, línea celular de cáncer gástrico humano MKN-45 (ATCC TCP-1008) y línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano LS180 (ATCC CL-187). Los ensayos se realizaron como se describe para las líneas de células tumorales MV-3 y WM-266-4 que expresan FAP en el ejemplo 5.3.

Se establecieron puertas en células tumorales vivas y se transfirieron MFI de fragmento F(ab')2 caprino específico de fragmento Fc*γ* de IgG anti-IgG humana de AffiniPure conjugado con PE frente a la concentración titulada de

construcciones de fusión Fc de ligando 4-1BB trimérico dividido dirigido.

La **figura 44** muestra la unión de las construcciones 5.7 preparadas en el ejemplo 11.2.7 a la línea celular gástrica humana MKN-45 que expresa CEA humano (izquierda) y la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano LSI80 (derecha). La **tabla 95** muestra los valores EC_{50} como se mide para la línea celular gástrica humana MKN-45 que expresa CEA humano.

Tabla 95: Unión a células tumorales que expresan CEA

Construcción	EC_{50} [nM] MKN45-8	EC_{50} [nM] LS180
5.7	11,6	14,4

Ejemplo 13

Actividad biológica de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen trímeros del ligando 4-1BB dirigido a CEA

13.1. Activación de NF-κB en células HeLa que expresan 4-1BB humano

Se generaron células HeLa que expresan 4-1BB humano y NF-κB-luciferasa como se describe en el ejemplo 6.1.

Activación de NF-κB en células Hela que expresan 4 -1BB humano cocultivadas con células tumorales que expresan CEA humano

Se cosecharon células humanas 4-1BB HeLa con NF-kB-luciferasa y se resuspendieron en un medio DMEM complementado con 10 % (v/v) de FBS y 1 % (v/v) GlutaMAX-I a una concentración de 0,2 x 10^6 células/ml. 100 µl (2 x 10^4 células) de esta suspensión celular se transfirieron a cada pocillo de una placa de cultivo tisular estéril blanca de 96 pocillos de fondo plano con tapa (greiner bio-one, n.º de cat. 655083) y la placa se incubaron a 37 °C y CO_2 al 5 % durante la noche. Al día siguiente, 50 µL de medio que contiene concentraciones tituladas de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido a CEA (trímero de 4-1BBL dividido de CEA) o moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB no dirigido a DP47 (trímero 4-1BBL dividido de DP47). De las líneas celulares tumorales que expresan CEA, la línea celular de cáncer gástrico humano MKN-45 (ATCC TCP-1008) se resuspendió en medio DMEM suministrado con FBS al 10 % (v/v) y GlutaMAX-I al 1 % (v/v) a una concentración de 2 x 10^6 células/ml.

La suspensión celular de linfoma de linfocitos B que expresan CEA (50 µl, proporción final 1:5) o solo medio se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron durante 6 horas a 37 °C y CO_2 al 5 %. Se lavaron las células dos veces con 200 µL/pocillo de DPBS. 40 µl de tampón de lisis indicador de reciente preparación (Promega, n.º de cat.: E3971) se añadieron a cada pocillo y las placas se almacenaron durante la noche a -20 °C. Al día siguiente, las placas de células congeladas y el tampón de detección (Luciferase 1000 Assay System, Promega, n.º de cat. E4550) se descongelaron a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µL de tampón de detección a cada pocillo y se midió la actividad de luciferasa lo más rápido posible usando un lector de microplacas SpectraMax M5/M5e y un software SoftMax Pro (Molecular Devices) contando la emisión de luz en URL (unidades de luz liberada por 0,5s/pocillo) o el lector de placas de contador de marcador múltiple Victor3 1420 (Perkin Elmer) y el software de gestión Perkin Elmer 2030 que cuenta la emisión de luz como recuentos por segundo (CPS) y se transfiere frente a la concentración de las construcciones sometidas a prueba.

Moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando 4-1BB dirigido a CEA, construcciones 5.7 y 5.8, desencadenaron la activación de la vía de señalización NF-κB en la línea celular indicadora en presencia de células MKN-45 de la línea celular de cáncer gástrico humano. Por el contrario, las moléculas de control no dirigidas no lograron desencadenar tal efecto en ninguna de las concentraciones probadas (Figura 45). La tabla 96 muestra los valores de CE50 correspondientes.

Tabla 96: Unión a células tumorales que expresan CEA

Construcción	EC_{50} [nM] MKN-45 sin células tumorales	EC_{50} [nM] MKN45
5.4	3,1	0,34
5.6	2,05	0,21
5.7	0,85	0,05
5.8	1,52	0,45

Ejemplo 14

14.1 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc que contienen un trímero de ligando OX40 dirigido a FAP

La secuencia de ADN que codifica parte del ectodominio (aminoácidos 51-183) del ligando humano OX40 se sintetizó de acuerdo con la secuencia P23510 de la base de datos Uniprot. Para disminuir la heterogeneidad del ligando humano Ox40 debido a la glicosilación, los residuos de asparagina en la posición 90 y 114 se mutaron a ácido aspártico mediante mutagénesis dirigida al sitio (de acuerdo con Compaan D.M., Hymowitz S.G., Structure (2006) 14(8), 1321-30).

Se clonó un polipéptido que contenía dos ectodominios del ligando OX40, separados por conectores (G4S)2 y fusionado al dominio de IgG1-CL humano, como se representa en la **figura 46A:** ligando humano OX40, conector (G4S)2, ligando humano OX40, conector (G4S)2, CL humano.

Se clonó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando OX40 y se fusionó con el dominio IgG1-CH humano, como se describe en la **figura 46B:** ligando humano OX40, conector (G4S)2, CH humano.

Para mejorar el emparejamiento correcto, se han introducido las siguientes mutaciones en el CH-CL cruzado. En el ligando dimérico 4-1BB fusionado con CL, E123R y Q124K humanos. En el ligando monomérico 4-1BB fusionado con CH1, K147E y K213E humanos.

La generación y preparación de los aglutinantes de FAP se describe en el documento WO 2012/020006 A2, que se incorpora en el presente documento como referencia.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican una proteína de unión específica para FAP, clon 28H11, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido 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.

La combinación de la cadena de botón de ligando dimérico-Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión CH1 monomérica, la cadena de ojal anti-FAP-Fc dirigida que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-FAP permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando OX40 trimérico ensamblado y una Fab de unión a FAP (**figura 46C**, construcción 6.1).

La **tabla 97** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de OX40 (51-183) trimérico dividido dirigido a CEA (T84.66-LCHA) monovalente con CH-CL cruzado y residuos cargados (construcción 6.1).

Tabla 97: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión (kih) de Fc ligando de OX40 trimérico dividido dirigido a FAP(28H1) monovalente que contiene el cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 6.1). * para residuos cargados

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
353	Secuencia de nucleótidos, OX40L hu dimérico (51-183) - CL* cadena de botón Fc	CAGGTGTCCCACAGATACCCCAGAATCCAGAGCATCAA GGTGCAGTTCACCGAGTACAAGAAAGAGAAGGGCTTCA TCCTGACCAGCCAGAAAGAGGACGAGATCATGAAGGTG CAGGACAACAGCGTGATCATCAACTGCGACGGCTTCTA CCTGATCAGCCTGAAGGGCTACTTCAGCCAGGAAGTGG ACATCAGCCTGCACTACCAGAAGGACGAGGAACCCCTG TTCCAGCTGAAGAAAGTGCGGAGCGTGAACAGCCTGAT GGTGGCCAGCCTGACCTACAAGGACAAGGTGTACCTGA ACGTGACCACCGACAACACCAGCCTGGACGACTTCCAC GTGAACGGCGGCGAGCTGATCCTGATTCACCAGAACCC CGGCGAGTTCTGCGTGCTGGGAGGCGGAGGATCTGGCG GAGGCGGATCTCAGGTGTCACACCGCTACCCCCGGATTC AGTCCATTAAGGTGCAGTTTACAGAGTATAAGAAAGAA AAAGGCTTTATTCTGACTTCCCAGAAAGAAGATGAGATT ATGAAGGTGCAGGATAATTCTGTGATCATCAATTGTGAC GGCTTCTACCTGATCAGCCTGAAGGGCTACTTCAGCCAG GAAGTGGACATCAGCCTGCACTACCAGAAGGACGAGGA ACCCCTGTTCCAGCTGAAGAAAGTGCGGAGCGTGAACA GCCTGATGGTGGCCAGCCTGACCTACAAGGACAAGGTG TACCTGAACGTGACCACCGACAACACCAGCCTGGACGA CTTCCACGTGAACGGCGGCGAGCTGATCCTGATCCACCA GAACCCTGGCGAGTTCTGCGTGCTGGGAGGCGGAGGCT CCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCT GTCTTTATCTTCCCACCCAGCGACCGGAAGCTGAAGTCT GGCACAGCCAGCGTCGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAC CCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGC CCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGC AGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACC CTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGT GTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCC CGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACAAGA CCCACACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTG GCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGG ACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGC GTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAA GTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATG CCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

354	Secuencia de nucleótidos, OX40L hu monomérico (51-183) - CH1*	CAGGTGTCCCACAGATACCCCAGAATCCAGAGCATCAA GGTGCAGTTCACCGAGTACAAGAAAGAGAAGGGCTTCA TCCTGACCAGCCAGAAAGAGGACGAGATCATGAAGGTG CAGGACAACAGCGTGATCATCAACTGCGACGGCTTCTA CCTGATCAGCCTGAAGGGCTACTTCAGCCAGGAAGTGG ACATCAGCCTGCACTACCAGAAGGACGAGGAACCCCTG TTCCAGCTGAAGAAAGTGCGGAGCGTGAACAGCCTGAT GGTGGCCAGCCTGACCTACAAGGACAAGGTGTACCTGA ACGTGACCACCGACAACACCAGCCTGGACGACTTCCAC GTGAACGGCGGCGAGCTGATCCTGATTCACCAGAACCC CGGCGAGTTCTGCGTGCTGGGAGGCGGAGGTTCCGGAG GCGGAGGATCTGCTAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTC CCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAAC AGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGGAAGATTACTTCCCCGA GCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCTGACAAG CGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCG GCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCA GCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGA ACCCAAGTCCTGC
68	Secuencia de nucleótidos, cadena de ojal Fc anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2
69	Secuencia de nucleótidos, cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2
355	OX40L hu dimérico (51-183) - CL* cadena de botón Fc	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQDN SVIINCDGFYLISLKGYFSQEVDISLHYQKDEEPLFQLKKVR SVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILI HQNPGEFCVLGGGGSGGGGSQVSHRYPRIQSIKVQFTEYK KEKGFILTSQKEDEIMKVQDNSVIINCDGFYLISLKGYFSQE VDISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLN VTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVLGGGGSGGGG SRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
356	OX40L hu monomérico (51-183) - CH1*	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQDN SVIINCDGFYLISLKGYFSQEVDISLHYQKDEEPLFQLKKVR SVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILI HQNPGEFCVLGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKS C
18	cadena de ojal Fc anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2
19	cadena ligera anti-FAP(28H1)	véase la tabla 2

14.2 Preparación de IgG1 humana no dirigida como control F

Una molécula de control usada en los ensayos, denominada control F **(figura 46D),** fue un DP47 no dirigido, control de línea germinal, IgG1 humana, que contiene las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala, para anular la unión a receptores gamma Fc de acuerdo con el procedimiento descrito en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2012/130831). Su preparación se describe en el ejemplo 2.3. La **tabla 29** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de las secuencias de ADNc y de aminoácidos de PGLALA huIgG1 de DP47 no dirigido (control F).

14.3 Producción de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc del ligando OX40 trimérico dividido dirigido a FAP y sus moléculas de control

Las secuencias codificantes de fusión (kih) de Fc ligando de OX40 trimérico dividido dirigido y no dirigido se clonaron en un vector plásmido, que dirige la expresión del inserto a partir de un promotor MPSV y contiene una secuencia poliA sintética localizada en el extremo 3' del CDS. Además, el vector contiene una secuencia de EBV OriP para el mantenimiento episomal del plásmido.

Se produjo la fusión (kih) de Fc ligando de Ox40 trimérico dividido cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamífero usando polietilenimina. Se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión. Para las variantes 1, 2, 4, 5 y su control B, D y E, en una proporción de 1:1:1:1 ("vector ligando dimérico-CL-cadena de botón": "vector fusión de ligando monomérico-CH1": "vector Fab anti-FAP-cadena de ojal": "vector cadena ligera anti-FAP"). Para la variante 3, 6 y su control C, a una proporción de 1:1:1 ("vector cadena de ligando dimérico de ojal Fc de huIgG1": "vector cadena de ligando monomérico de botón Fc de huIgG1": "vector cadena ligera anti-FAP"). Las IgG humanas, usadas como control z en el ensayo, se produjeron como para la construcción biespecífica (para la transfección solo se usó un vector para la cadena ligera y un vector para la cadena pesada en una proporción de 1:1).

Para la producción en matraces de agitación de 500 mL, se sembraron 300 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, se centrifugaron las células durante 10 minutos a 210 x g y se reemplazó el sobrenadante por 20 mL de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión (200 µg de ADN total) se mezclaron en 20 mL de medio CD CHO. Después de la adición de 540 µL de PEI, la solución se agitó en vórtex durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezclaron las células con la solución ADN/PEI, se transfirieron a un matraz de agitación de 500 mL y se incubó durante 3 horas a 37°C en una incubadora con una atmósfera de CO2 al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 160 mL de medio Excell complementado con L-glutamina 6 mM, 5 g/L de PEPSOY y ácido valproico 1,2 mM y se cultivaron las células durante 24 horas. Un día después de la transfección se añadió Feed al 12 % (aminoácidos y glucosa). Después de cultivarse durante 7 días, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación durante 30-40 minutos al menos 400 x g. La solución se filtró en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm), se suplementó con acida sódica hasta una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantuvo en 4°C.

La molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de OX40 trimérico dividido, así como la IgG, se purificó a partir de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando la proteína A, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, se cargó el sobrenadante en una columna MabSelect Sure (CV = 5-15 mL, resina de GE Healthcare) equilibrado con fosfato de sodio (20 mM), tampón de citrato de sodio (20 mM) (pH 7,5). La proteína no unida se eliminó lavando con al menos 6 volúmenes de columna del mismo tampón. La proteína unida se eluyó usando un gradiente lineal (20 CV) o una elución escalonada (8 CV) con citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, tampón de glicina 100 mM (pH 3,0). Para el gradiente lineal, se aplicó una elución escalonada adicional de 4 volúmenes de columna.

El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/10 (v/v) de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0. La proteína se concentró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, solución Tween20 al 0,01 % (v/v) de pH 6,0.

Se determinó la concentración de proteína midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando un coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos. La pureza y el peso molecular de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dirigido se analizaron mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con Coomassie SimpleBlue™ SafeStain (Invitrogen USA) o CE-SDS usando Caliper LabChip GXII (Perkin Elmer). Se analizó el contenido de agregado de las muestras usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) en K2HPO4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN3 al 0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7 a 25 °C.

La **tabla 98** resume el rendimiento y el contenido final de monómero de la molécula de unión a antígeno de fusión (kih) de Fc ligando de Ox40 trimérico dividido dirigido a FAP, y de la PGLALA de IgG1 humana línea germinal DP47 (control F).

Tabla 98: Análisis bioquímico de la fusión (kih) de Fc ligando de 4-1BB trimérico dividido dirigido a CEA.

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
fusión Fc de ligando Ox40 trimérico dividido dirigido a FAP(28H1) monovalente que contiene cruce de CH-CL con residuos cargados (construcción 6.1)	93,8	19,7
línea germinal DP47 PGLALA de IgG1 humana	100	50

Ejemplo 15

Caracterización funcional de la molécula de unión a antígeno de fusión Fc que contiene un trímero de ligando OX40 dirigido

15.1 Unión a células tumorales que expresan FAP humana

La unión a la FAP de la superficie celular se probó usando células WM-266-4 (ATCC CRL-1676). Se añadieron 0,5 x 105 de células WM-266-4 a cada pocillo de placas de 96 pocillos de fondo redondo (greiner bio-one, cellstar, n.º de cat. 650185). Las células se tiñeron durante 120 minutos a 4 °C en la oscuridad en 50 µL/pocillo de tampón FACS frío a 4 °C (DPBS (Gibco by Life Technologies, n.º de cat. 14190 326) con BSA (0,1 % p/v, Sigma -Aldrich, n.º de cat. A9418) que contiene la construcción de anticuerpo anti-Ox40 titulado. Después de lavar tres veces con exceso de tampón FACS, las células se tiñeron durante 45 minutos a 4 °C en la oscuridad en 25 µL/pocillo de tampón FACS frío a 4 °C que contenía fragmentos $F(ab')_2$ de IgG caprino específico de fragmento Fγ de IgG antihumana de AffniPure conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109 096 098).

Las placas se resuspendieron finalmente en 90 µL/pocillo de tampón FACS que contenía 0,2 µg/mL de DAPI (Santa Cruz Biotec, n.º de cat. Sc-3598) y se adquirieron el mismo día usando LSR-Fortessa de 5 láseres (BD Bioscience con software DIVA).

Como se muestra en la **figura 47A**, la molécula de unión a antígeno (FAP-OX40L) de fusión (kih) de Fc ligando de trimérico Ox40 dividido dirigido a FAP(28H1) monovalente, aunque no el control negativo F, se unió eficazmente a las células diana que expresan FAP humana. El valor de EC50 de unión a WM-266-4 positiva para FAP fue de [6,9 nM].

15.2 Unión a células tumorales negativas para OX40 y FAP

La falta de unión a células tumorales humanas negativas para FAP negativas para OX40 se probó usando glóbulos rojos A549 NucLight™ (Essenbioscience, n.º de cat. 4491) que expresaban la proteína fluorescente roja NucLight restringida al núcleo para permitir la separación de células WM266-4 positivas para FAP humanas no marcadas. Se transdujeron las A549 originales (ATCC CCL-185) con el lentivirus rojo NucLight de Essen CellPlayer (Essenbioscience, n.º de cat. 4476; EF1α, puromicina) a una MOI de 3 (TU/célula) en presencia de 8 µg/ml de polibreno siguiendo el protocolo estándar de Essen.

Se añadió una mezcla de 5 x 104 células WM266-4 no marcadas y glóbulos rojos A549 NucLight™ no marcados en tampón FACS a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de células en suspensión de fondo redondo y se realizó el ensayo de unión como se describe en la sección 15.1.

Como se muestra en la **figura 47B,** FAP-OX40L no se unió a células tumorales humanas negativas para FAP negativas para OX40.

15.3 Unión a células que expresan OX40 humana: leucocitos mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) indiferenciados y activados

Las capas leucocitarias se obtuvieron del centro de donación de sangre de Zúrich. Para aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) frescas, la capa leucocitaria se diluyó con el mismo volumen de DPBS (Gibco de Life Technologies, n.º de cat. 14190 326). Se suministraron tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL (TPP, n.° de cat. 91050) con 15 mL de Histopaque 1077 (SIGMA Life Science, n.° de cat. 10771, polisucrosa y diatrizoato de sodio, ajustados a una densidad de 1,077 g/mL) y la solución de capa leucocitaria diluida se estratificó sobre el Histopaque 1077. Los tubos se centrifugaron durante 30 minutos a 400 x g, temperatura ambiente y con baja aceleración y sin pausa. Posteriormente, las PBMC se recolectaron de la interfase, se lavaron tres veces con DPBS y se resuspendieron en medio de linfocitos T que consistía en medio RPMI 1640 (Gibco de Life Technology, n.º de cat. 42401-042) suministrado con suero bovino fetal al 10 % (FBS, Gibco de Life Technology, n.º de cat. 16000-044, lote 941273, irradiado con rayos gamma, sin micoplasma e inactivado por calor

a 56 °C durante 35 minutos), GlutaMAX I al 1 % (v/v) (GIBCO de Life Technologies, n.º de cat. 35050 038), piruvato de sodio 1 mM (SIGMA, n.º de cat. S8636), 1 % (v/v) de aminoácidos no esenciales MEM (SIGMA, n.º de cat. M7145) y β- mercaptoetanol 50 µM (SIGMA, M3148).
Las PBMC se usaron directamente después del aislamiento (unión a PBMC humanas en reposo) o se estimularon para recibir una fuerte expresión de Ox40 humana en la superficie celular de los linfocitos T (unión a PBMC humanas activadas). Por lo tanto, las PBMC indiferenciadas se cultivaron durante cuatro días en un medio de linfocitos T suministrado con 200 U/mL de proleucina (Novartis) y 2 ug/mL de PHA-L (Sigma-Aldrich, L2769-10) en una placa de cultivo tisular de 6 pocillos y, a continuación, durante la noche, en placas de cultivo tisular de 6 pocillos recubiertas previamente [4 ug/mL] de anti-CD3 humano (clon OKT3, eBioscience, n.º de cat. 16-0037-85) y [2 ug/mL] de anti-CD28 humano (clon CD28.2, eBioscience, n.º de cat. 16-0289-85) en un medio de linfocitos T suministrado con 200 U/mL de proleucina a 37 °C y CO_2 al 5 %.

Para la detección de Ox40 se mezclaron PBMC humanas indiferenciadas y PBMC humanas activadas. Para permitir la distinción de las PBMC humanas indiferenciadas de las activadas, se marcaron células nativas antes del ensayo de unión usando el colorante de proliferación celular eFluor670 (eBioscience, n.º de cat. 65-0840-85).

Para el marcado, las células se recolectaron, se lavaron con DPBS precalentado (37 °C) y se ajustaron a una densidad celular de 1 x 10^7 células/mL en DPBS. Se añadió colorante de proliferación celular eFluor670 (eBioscience, n.º de cat. 65-0840-85) a la suspensión de PBMC humanas indiferenciadas a una concentración final de 2,5 mM y una densidad celular final de 0,5 x 10^7 células/mL en DPBS. A continuación, las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Para detener la reacción de marcado, se añadieron 4 mL de FBS inactivado por calor y las células se lavaron tres veces con medio de linfocitos T. Una mezcla de dos a uno de 1 x 10^5 PBMC humana marcada con eFluor670 en reposo y 0,5 x 10^5 de PBMC humana activada no marcada se añadió a continuación a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo para células en suspensión (greiner bio-one, cellstar, n.º de cat. 650185).

Las células se tiñeron durante 120 minutos a 4 °C en la oscuridad en 50 µL/pocillo de tampón FACS frío a 4 °C que contenía construcciones de anticuerpos anti-Ox40 titulados. Después de lavar tres veces con exceso de tampón FACS, las células se tiñeron durante 45 minutos a 4 °C en la oscuridad en tampón FACS frío de 25 µL/pocillo a 4 °C que contenía una mezcla de anti-CD4 humano marcado con fluorescencia (clon RPA-T4, IgGl k de ratón, BioLegend, n.º de cat. 300532), anti-CD8 humano (clon RPa-T8, IgG1k de ratón, BioLegend, n.º de cat. 3010441) y fragmento F(ab')2 de IgG caprino específico de fragmento Fγ de anti -IgG humana de AffniPure conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109 096 098).

Las placas se resuspendieron finalmente en 90 µL/pocillo de tampón FACS que contenía 0,2 µg/mL de DAPI (Santa Cruz Biotec, n.º de cat. Sc-3598) y se adquirieron el mismo día usando LSR-Fortessa de 5 láseres (BD Bioscience con software DIVA).

Como se muestra en las **figuras 48A y 48 B**, FAP-OX40L no se unió a los linfocitos T CD4+ o a los linfocitos T CD8+ humanos en reposo, que son negativos para OX40. Por el contrario, FAP-OX40L se unió a los linfocitos T CD8+ o CD4+ activados, que sí expresan OX40. La unión a los linfocitos T CD4+ fue mucho más fuerte que a los linfocitos T CD8+. Los linfocitos T CD8+ humanos activados expresan solo una fracción de los niveles de OX40 detectados en los linfocitos T CD4+ activados. Los niveles de expresión de OX40 dependen de la cinética y la fuerza de estimulación y las condiciones se optimizaron aquí para la expresión de OX40 en linfocitos T CD4+ pero no para linfocitos T CD8+. Por tanto, solo se indujo una pequeña expresión de OX40 en los linfocitos T CD8. El valor de EC 50 de la unión a linfocitos T CD4+ o CD8+ positivos para OX40 fue de [0,15 nM].

15.4 Activación de NFκB en células HeLa que expresan OX40 humano y el gen indicador NFκB-luciferasa

La unión agonista de Ox40 a su ligando induce la señalización descendente mediante la activación del factor nuclear kappa B (NFκB) (A. D. Weinberg et al., J. Leukoc. Biol. 2004, 75(6), 962-972). Se generó la línea celular indicadora recombinante HeLa_hOx40_NFκB_Lucl para expresar Ox40 humano en su superficie. Adicionalmente, alberga un plásmido indicador que contiene el gen de la luciferasa bajo el control de un segmento potenciador sensible a NFκB. La activación de Ox40 induce la activación dependiente de la dosis de NF κB, que se transloca en el núcleo, donde se une al potenciador sensible a NFκB del plásmido indicador para aumentar la expresión de la proteína luciferasa. La luciferasa cataliza la oxidación de la luciferina dando como resultado oxiluciferina que emite luz. Esto se puede cuantificar con un luminómetro. Por tanto, se analizó la capacidad de las diversas moléculas anti-Ox40 para inducir la activación de NFκB en células indicadoras HeLa_hOx40_NFkB_Lucl como medida de bioactividad.

Se recolectaron células adherentes HeLa_hOx40_NFkB_Lucl usando tampón de disociación celular (Invitrogen, n.º de cat. 13151-014) durante 10 minutos a 37 °C. Las células se lavaron una vez con DPBS y se ajustaron a una densidad celular de 1,33 x 10^5 en medio de ensayo que comprende MEM (Invitrogen, n.º de cat. 22561-021), FBS inactivado por calor al 10 % (v/v), piruvato de sodio 1 mM y 1 % (v/v) de aminoácidos no esenciales. Las células fueron sembradas en una densidad de 0,2 x 10^5 células por pocillo en una placa de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos blanca estéril con tapa (Greiner Bio-One, n.º de cat. 655083) y se mantuvieron durante la noche a 37 °C

y CO_2 al 5 % en una incubadora (Hera Cell 150).

Al día siguiente, se estimularon HeLa_hOx40_NFkB_Lucl durante 5 horas mediante la adición de medio de ensayo que contenía FAP-Ox40L titulado o control negativo F. Para probar el efecto de la hiperreticulación en los anticuerpos anti-Ox40, se añadieron 25µL/pocillo de medio que conte nía el fragmento $F(ab')_2$ de IgG caprino específico de Fcγ de anti-IgG humana de anticuerpo secundario (Jackson ImmunoResearch, 109-006-098) en una proporción de 1:2 (2 veces más anticuerpo secundario que el anticuerpo primario). Después de la incubación, se aspiró el sobrenadante y las placas se lavaron dos veces con DPBS. La cuantificación de la emisión de luz se realizó usando el sistema de ensayo de luciferasa 100 y el tampón de lisis indicador (ambos de Promega, n.º de cat. E4550 y n.º de cat. E3971) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se lisaron durante 10 minutos a -20 °C mediante la adición de 30 uL por pocillo de tampón de lisis 1x. Las células se descongelaron durante 20 minutos a 37 °C antes de suministrar 90 uL por pocillo del reactivo de ensayo de luciferasa. La emisión de luz se cuantificó inmediatamente con un lector de microplacas SpectraMax M5/M5e (Molecular Devices, EE. UU.), usando un tiempo de integración de 500 ms, sin ningún filtro para captar todas las longitudes de onda. Las unidades de luz relativa emitidas (URL) se corrigieron mediante luminiscencia basal de células HeLa_hOx40_NFkB_Lucl y se transfirieron frente a la concentración de anticuerpo primario logarítmico usando Prism4 (software GraphPad, EE. UU.). Las curvas se ajustaron usando la respuesta a la dosis sigmoidea incorporada.

Como se muestra en la **figura 49**, ya se indujo una activación de NFkB dependiente de la dosis limitada mediante la adición de FAP-Ox40L (lado izquierdo) a la línea celular indicadora. La hiperreticulación de FAP-Ox40L por anticuerpos secundarios específicos de anti-IgG humana aumentó la inducción de la activación de luciferasa mediada por NFκB de una manera dependiente de la concentración (lado derecho).

En consecuencia, se sometió a prueba la capacidad de activación de NFkB de FAP-Ox40L con hiperreticulación de las construcciones por líneas de células tumorales FAP+.

La línea celular tumoral sometida a prueba fue el clon 39 de NIH/3T3-huFAP. El clon 39 de NIH/3T3-huFAP se generó mediante la transfección de la línea celular NIH/3T3 de fibroblastos embrionarios de ratón (ATCC CRL-1658) con el vector de expresión pETR4921 para expresar huFAP en una selección de puromicina de 1,5 µg/mL. La expresión superficial de FAP se cuantificó usando el Quifikit (Dako, n.º de cat. K0078) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo primario usado para detectar la expresión de FAP en la superficie celular fue el clon F11-24 de reacción cruzada humano/ratón (IgG1 de ratón, Calbiochem, n.º de cat. OP188). La expresión superficial en el clon 39 de NIH/3T3-huFAP fue de aproximadamente 90000 huFAP por célula.

Como se describe anteriormente en el presente documento, las células HeLa_hOx40_NFκB_Lucl adherentes se cultivaron durante la noche a una densidad celular de 0,2 x 10^5 células por pocillo y se estimularon durante 5 horas con medio de ensayo que contenía FAP-OX40L titulada. Para someter a prueba el efecto de la hiperreticulación mediante la unión de FAP de la superficie celular, se cocultivaron 25 µL/pocillo de medio que contenía células tumorales del clon 39 de FAP+NIH/3T3-huFAP en una proporción de 3 a 1 (tres veces más células tumorales FAP+ que células indicadoras por pocillo). El NF κB activado se cuantificó al medir la emisión de luz usando el sistema de ensayo de luciferasa 100 y el tampón de lisis indicador (ambos de Promega, n.º de cat. E4550 y n.º de cat. E3971.

Como se muestra en la **figura 50A**, la presencia de células tumorales que expresan FAP aumentó fuertemente la inducción de la activación de luciferasa mediada por NF κB cuando se añadió FAP-Ox40L. El área bajo la curva de las respectivas curvas de respuesta a la dosis transferida se cuantificó como un marcador de la capacidad agonista de cada construcción. Como se muestra en la **figura 50A**, la presencia de superficie celular presente en FAP aseguró una mayor reticulación y por tanto un mejor efecto agonista de FAP-Ox40L que la adición de un anticuerpo secundario específico de Fc.

15.5 La coestimulación mediada por OX40 de TCR subóptima desencadenó PBMC humanas en reposo e hiperreticulación por FAP de la superficie celular

En el ejemplo 15.4 se demostró que la adición de células tumorales FAP+ puede aumentar fuertemente la actividad de NFkB inducida por OX40L dirigido a FAP en líneas celulares indicadoras positivas para Ox40 humanas proporcionando una fuerte oligomerización de los receptores OX40. De forma similar, se sometieron a prueba las construcciones FAP-OX40L en presencia de células del clon 39 de NIH/3T3-huFAP para determinar su capacidad para rescatar la estimulación subóptima de TCR de células PBMC humanas en reposo.

Las preparaciones de PBMC humanas contienen (1) linfocitos T CD4+ y CD8+ negativos para Ox40 en reposo y (2) células presentadoras de antígeno con diversas moléculas receptoras de Fc-γ en su superficie celular, por ejemplo, linfocitos B y monocitos. El anticuerpo anti-CD3 humano del isotipo de IgG1 humano se puede unir con su parte Fc a las presentes moléculas receptoras de Fc-γ y mediar una activación prolongada de TCR en linfocitos T CD4+ y CD8+ negativos para Ox40 en reposo. Estas células a continuación comienzan a expresar Ox40 en varias horas. Los compuestos agonistas funcionales frente a Ox40 pueden señalizar por medio del receptor Ox40 presente en los linfocitos T CD8+ y CD4+ activados y apoyar la estimulación mediada por TCR.

Se estimularon PBMC humanas marcadas con CFSE en reposo durante cinco días con una concentración subóptima de anticuerpo anti-CD3 en presencia de células del clon 39 de NIH/3T3-huFAP FAP+ irradiadas y FAP-Ox40L titulado. Los efectos sobre la supervivencia y proliferación de los linfocitos T se analizaron mediante la supervisión del recuento total de células y la dilución de CFSE en células vivas mediante citometría de flujo.

Se recolectaron células del clon 39 de NIH/3T3-huFAP de fibroblasto embrionario de ratón (véase el ejemplo 15.4) usando tampón de disociación celular (Invitrogen, n.º de cat. 13151-014) durante 10 minutos a 37 °C. Las células se lavaron una vez con DPBS. Células del clon 39 de NIH/3T3-huFAP se cultivaron a una densidad de 0,2 x 10^5 células por pocillo en medios de linfocitos T en una placa de cultivo tisular de adhesión de fondo redondo de 96 pocillos estéril (TPP, n.º de cat. 92097) durante la noche a 37 °C y CO_2 al 5 % en una incubadora (Hera Cell 150). Al día siguiente, se irradiaron en un irradiador de rayos x usando una dosis de 4500 RAD para prevenir el posterior crecimiento excesivo de PBMC humanas por la línea de células tumorales.

Se aislaron PBMC humanas mediante centrifugación de densidad ficoll como se describe en el ejemplo 15.3. Las células se marcaron a continuación con CFSE a una densidad celular de 1x10^6 células/mL con CFDA-SE (Sigma-Aldrich, n.º de cat. 2188) a una concentración final de [50 nM] durante 10 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con un exceso de DPBS que contenía FBS (10 % v/v). Las células marcadas se dejaron reposar en medio de linfocitos T a 37 °C durante 30 minutos. Después de esto, el CFDA-SE no convertido se eliminó mediante dos etapas de lavado adicionales con DPBS. Se añadieron PBMC humanas en reposo marcadas con CFSE a cada pocillo a una densidad de 0,5 x 10^5 células por pocillo. El anticuerpo anti-CD3 humano (clon V9, IgG1 humana, descrito en Rodrigues et al., Int J Cancer Suppl 7, 45-50 (1992) y la patente de EE.UU. n.º 6.054.297) a una concentración final de [20 nM] y FAP-OX40L se añadieron a las concentraciones indicadas. Las células se activaron durante cinco días a 37 °C y CO_2 al 5 % en una incubadora (Hera Cell 150). A continuación, las células se tiñeron superficialmente con anticuerpos anti-CD4 humanos conjugados con colorante fluorescente (clon RPA-T4, BioLegend, n.º de cat. 300532) y CD8 (clon RPa-T8, BioLegend, n.º de cat. 3010441) durante 20 minutos a 4 °C. Después de una etapa de lavado con tampón FACS, las células se resuspendieron en tampón FACS a 85 µL/pocillo y se adquirieron usando un citómetro de flujo Fortessa de 5 láseres (BD Bioscience con software DIVA).

Como se muestra en la **figura 51**, la hiperreticulación de las construcciones FAP-OX40L por las células presentes del clon 39 de NIH/3T3-huFAP promovió fuertemente la proliferación (véanse los gráficos de "Acontecimientos" en la parte superior) y la supervivencia (véanse los gráficos de "proliferación" en la parte inferior) en linfocitos T CD4 y CD8 humanos estimulados con TCR. En consonancia con una menor expresión de OX40 en los linfocitos T CD8+ humanos, el efecto agonista de FAP-OX40L fue menos fuerte en los linfocitos T CD8+ que en los linfocitos T CD4+.

Citas:

Ascierto, P. A., E. Simeone, M. Sznol, Y. X. Fu, y I. Melero (2010), Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PDl therapeutic antibodies. Semin Oncol 37:508-516.

Aggarwal B.B. (2003), Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat. Rev. Immunol. 3(9),745-56.

Banner D. et al (1993), Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. Cell 73, 431-445.

Bodmer J., Schneider P. y Tschopp, J. (2002), The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends in Biochemical Sciences 27(1), 19-26.

Broll, K., Richter, G., Pauly, S., Hofstaedter, F., y Schwarz, H. (2001). CD137 expression in tumor vessel walls. High correlation with malignant tumors. Am J Clin Pathol 115, 543-549.

Buechele, C., Baessler, T., Schmiedel, B.J., Schumacher, C.E., Grosse-Hovest, L., Rittig, K., y Salih, H.R. (2012). 4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia. Eur J Immunol 42, 737-748.

Choi, B.K., Kim, Y.H, Kwon, P.M., Lee, S.C., Kang, S.W., Kim, M.S., Lee, M.J., y Kwon, B.S. (2009). 4-1BB functions as a survival factor in dendritic cells. J Immunol 182, 4107-4115.

Cuadros, C., Dominguez, A.L., Lollini, P.L., Croft, M., Mittler, R.S., Borgstrom, P., y Lustgarten, J. (2005). Vaccination with dendritic cells pulsed with apoptotic tumors in combination with anti-OX40 and anti-4-1BB monoclonal antibodies induces T cell-mediated protective immunity in Her-2/neu transgenic mice. Int J Cancer 116, 934-943.

Curran, M.A., Kim, M., Montalvo, W., Al-Shamkhani, A., y Allison, J.P. (2011). Combination CTLA-4 blockade and

4-1BB activation enhances tumor rejection by increasing T-cell infiltration, proliferation, and cytokine production. PLoS One 6, el9499.

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.

Futagawa, T., Akiba, H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H., y Okumura, K. (2002). Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. Int Immunol 14, 275-286.

Guo, Z., Cheng, D., Xia, Z., Luan, M., Wu, L., Wang, G., y Zhang, S. (2013). Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer. J Transl Med 11, 215.

Heinisch, I.V., Daigle, I., Knopfli, B., y Simon, H.U. (2000). CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils. Eur J Immunol 30, 3441-3446.

Hornig, N., Kermer, V., Frey, K., Diebolder, P., Kontermann, R.E., Mueller, D. (2012), Combination of a bispecific antibody and costimulatory antibody-ligand fusion proteins for targeted cancer immunotherapy. J. Immunother. 35, 418-429.

Ju, S.A., Cheon, S.H., Park, S.M., Tam, N.Q., Kim, Y.M., An, W.G., y Kim, B.S. (2008). Eradication of established renal cell carcinoma by a combination of 5-fluorouracil and anti-4-1BB monoclonal antibody in mice. Int J Cancer 122, 2784-2790.

Kienzle, G., y von Kempis, J. (2000). CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. Int Immunol 12, 73-82.

Kim, D.H., Chang, W.S., Lee, Y.S., Lee, K.A., Kim, Y.K., Kwon, B.S., y Kang, C.Y. (2008). 4-1BB engagement costimulates NKT cell activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. J Immunol 180, 2062-2068.

Kim, Y.H., Choi, B.K., Oh, H.S., Kang, W.J., Mittler, R.S., y Kwon, B.S. (2009). Mechanisms involved in synergistic anticancer effects of anti-4-1BB and cyclophosphamide therapy. Mol Cancer Ther 8, 469-478.

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.

Lee, H., Park, H.J., Sohn, H.J., Kim, J.M., y Kim, S.J. (2011). Combinatorial therapy for liver metastatic colon cancer: dendritic cell vaccine and low-dose agonistic anti-4-1BB antibody costimulatory signal. J Surg Res 169, e43-50.

Levitsky, V., de Campos-Lima, P.O., Frisan, T., y Masucci, M.G. (1998). The clonal composition of a peptide-specific oligoclonal CTL repertoire selected in response to persistent EBV infection is stable over time. J Immunol 161, 594-601.

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.

Lin, W., Voskens, C.J., Zhang, X., Schindler, D.G., Wood, A., Burch, E., Wei, Y., Chen, L., Tian, G., Tamada, K., et al. (2008). Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: insights into "agonistic" effects of anti-CD137 monoclonal antibodies. Blood 112, 699-707.

Melero, I., Johnston, J.V., Shufford, W.W., Mittler, R.S., y Chen, L. (1998). NK1.1 cells express 4-1BB (CDwl37) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. Cell Immunol 190, 167-172.

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.

Merchant, A.M., Zhu, Z., Yuan, J.Q., Goddard, A., Adams, C.W., Presta, L.G., y Carter, P. (1998). An efficient route to human bispecific IgG. Nat Biotechnol 16, 677-681.

Morales-Kastresana, A., Sanmamed, M.F., Rodriguez, I., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Labiano, S., Hervas-Stubbs, S., Sangro, B., Ochoa, C., Rouzaut, A., et al. (2013). Combined immunostimulatory monoclonal antibodies extend survival in an aggressive transgenic hepatocellular carcinoma mouse model. Clin Cancer Res 19, 6151-6162.

Mueller, D., Frey, K., Kontermann, R.E. (2008), A novel antibody-4-1BB1 fusion protein for targeted costimulation in cancer immunotherapy, J. Immunother. 31, 714-722.

Murillo, O., Dubrot, J., Palazon, A., Arina, A., Azpilikueta, A., Alfaro, C., Solano, S., Ochoa, M.C., Berasain, C., Gabari, I., et al. (2009). In vivo depletion of DC impairs the anti-tumor effect of agonistic anti-CD137 mAb. Eur J Immunol 39, 2424-2436.

Narazaki, H., Zhu, Y., Luo, L., Zhu, G., y Chen, L. (2010). CD137 agonist antibody prevents cancer recurrence: contribution of CD137 on both hematopoietic and nonhematopoietic cells. Blood 115, 1941-1948.

Nishimoto, H., Lee, S.W., Hong, H., Potter, K.G., Maeda-Yamamoto, M., Kinoshita, T., Kawakami, Y., Mittler, R.S., Kwon, B.S., Ware, C.F., et al. (2005). Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor. Blood 106, 4241-4248.

Olofsson, P.S., Soderstrom, L.A., Wagsater, D., Sheikine, Y., Ocaya, P., Lang, F., Rabu, C., Chen, L., Rudling, M., Aukrust, P., et al. (2008). CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. Circulation 117, 1292-1301.

Palazon, A., Teijeira, A., Martinez-Forero, I., Hervas-Stubbs, S., Roncal, C., Penuelas, I., Dubrot, J., Morales-Kastresana, A., Perez-Gracia, J.L., Ochoa, M.C., et al. (2011). Agonist anti-CD137 mAb act on tumor endothelial cells to enhance recruitment of activated T lymphocytes. Cancer Res 71, 801-811.

Schwarz, H., Valbracht, J., Tuckwell, J., von Kempis, J., y Lotz, M. (1995). ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. Blood 85, 1043-1052.

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.

Shi, W., y Siemann, D.W. (2006). Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment. Anticancer Res 26, 3445-3453.

Simeone, E., y Ascierto, P.A. (2012). Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD137, 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.

Stagg, J., Loi, S., Divisekera, U., Ngiow, S.F., Duret, H., Yagita, H., Teng, M.W., y Smyth, M.J. (2011). Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 7142-7147.

Teng, M.W., Sharkey, J., McLaughlin, N.M., Exley, M.A., y Smyth, M.J. (2009). CDld-based combination therapy eradicates established tumors in mice. J Immunol 183, 1911-1920.

von Kempis, J., Schwarz, H., y Lotz, M. (1997). Differentiation-dependent and stimulus-specific expression of ILA, the human 4-1BB-homologue, in cells of mesenchymal origin. Osteoarthritis Cartilage 5, 394-406.

Wei, H., Zhao, L., Li, W., Fan, K., Qian, W., Hou, S., Wang, H., Dai, M., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., y Guo, Y. (2013). Combinatorial PD-1 blockade and CD137 activation has therapeutic efficacy in murine cancer models and synergizes with cisplatin. PLoS One 8, e84927.

Wilcox, R.A., Chapoval, A.I., Gorski, K.S., Otsuji, M., Shin, T., Flies, D.B., Tamada, K., Mittler, R.S., Tsuchiya, H., Pardoll, DM., y Chen, L. (2002). Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. J Immunol 168, 4262-4267.

Wilcox, R.A., Tamada, K., Flies, D.B., Zhu, G., Chapoval, A.I., Blazar, B.R., Kast, W.M., y Chen, L. (2004). Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8+ cytolytic T lymphocytes in vivo. Blood 103, 177-184.

Zhang, N., Sadun, R.E., Arias, R.S., Flanagan, M.L., Sachsman, S.M., Nien, Y, Khawli, L.A., Hu, P., 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.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos una molécula 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 la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que

(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 se une 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 que comprenden la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho 4-1BBL que comprende la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectado por medio de un conector peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o

(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 que comprenden la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y al extremo C del dominio CH3 mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho 4-1BBL que comprende la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas por medio de un conector peptídico al extremo C del dominio CH3 de dicho polipéptido, o

(iii) el primer polipéptido contiene un dominio VH-CL o VL-CH1 y el segundo polipéptido contiene un dominio VL-CH1 o un dominio VH-CL, respectivamente, en el que el segundo polipéptido se une 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 que comprenden la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y a VH o VL mediante un conector peptídico y en el que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho 4-1BBL que comprende la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas por medio de un conector peptídico al VL o VH de dicho polipéptido, y

(c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable.

2. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el ectodominio de 4-1BBL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 96.

3. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el ectodominio de 4-1BBL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

4. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende

(a) al menos una molécula 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 el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99; 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: 96, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

5. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende

(a) al menos una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD19, y

(b) un primer polipéptido que contiene un dominio CH1 o CL y un segundo polipéptido que contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en el que el segundo polipéptido se une al primer polipéptido por un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en el que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 que están conectadas entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho 4-1BBL que comprende la 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectado por medio de un conector peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido.

6. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el dominio Fc es un dominio Fc de IgG, en particular un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4.

7. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones aminoacídicas en las posiciones 234 y 235 (numeración EU) y/o 329 (numeración EU).

8. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la molécula de unión a antígeno comprende

una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo las dos una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD19,

un primer péptido que comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 conectadas entre sí mediante un conector peptídico fusionado en su extremo C mediante un segundo conector peptídico a una segunda cadena pesada o ligera,

y un segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho 4-1BBL que 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: 96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374 y SEQ ID NO: 375 fusionada en su extremo C mediante un tercer conector peptídico con una segunda cadena ligera o pesada, respectivamente.

9. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la molécula de unión a antígeno comprende

(a) una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo las dos una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD19,

(b) una segunda cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99, y una segunda cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

10. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la molécula Fab 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: 195 o SEQ ID NO: 252, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 196 o SEQ ID NO: 253, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 197 o SEQ ID NO: 254, y un dominio VL que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 198 o SEQ ID NO: 249, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 199 o SEQ ID NO: 250, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 200 o SEQ ID NO: 251.

11. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la molécula Fab que se puede unir específicamente a CD19 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 o en la que la molécula Fab que se puede unir específicamente a CD19 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358.

12. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la molécula de unión a antígeno comprende

(i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 o

una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358,

(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 111 y SEQ ID NO: 113, y

(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112 y SEQ ID NO: 114.

13. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la molécula de unión a antígeno comprende

(i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202 o

una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358,

(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119 y SEQ ID NO: 173, y

(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120 y SEQ ID NO: 174.

14. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o 13, que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 205, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120.

15. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o 13, que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 306, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 279, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120.

16. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la molécula de unión a antígeno comprende

(i) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 209, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 210 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, o

(ii) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 213, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 214 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206, o

(iii) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 310 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 279, o

(iv) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 313, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 314 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 279.

17. Un polinucleótido aislado que codifica la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

18. Un vector, en particular, un vector de expresión, que comprende el polinucleótido aislado de la

reivindicación 16.

19. Una célula huésped que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 17 o el vector de la reivindicación 18.

20. Un procedimiento para producir la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende las etapas de

(i) cultivar la célula huésped de la reivindicación 19 en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno, y

(ii) recuperar la molécula de unión a antígeno.

21. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

22. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o la composición farmacéutica de la reivindicación 21 para su uso como medicamento.

23. La molécula de unión a antígeno que contiene un trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o la composición farmacéutica de la reivindicación 21 para su uso en el tratamiento de cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Moléculas de unión a antígeno que comprenden un trímero de ligando de la familia de TNF

<130> P32429-WO

<150> EP14193260.8
<151> 14-11-2014

<150> EP15183736.6
<151> 03-09-2015

<150> EP15188142.2
<151> 02-10-2015

<160> 375

<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 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
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

<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
        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> 378
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu (71-254) conectado por (G4S)2 a 4-1BBL hu (71-254)

<400> 5

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 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> 6
<211> 194
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu (71-254) más (G4S)2

<400> 6

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 Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser

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

<220>
<223> CDR-H1 FAP(28H1)

<400> 7

Ser His Ala Met Ser
1 5

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H2 FAP(28H1)

<400> 8

Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H3 FAP(28H1)

<400> 9

Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr
1 5

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L1 FAP(28H1)

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L2 FAP(28H1)

<400> 11

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L3 FAP(28H1)

<400> 12

Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro Pro Thr
1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> conector peptídico (G4S)2

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 14
<211> 718
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-254) más CH1 más cadena de botón de Fc

<400> 14

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 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 Gly Ser Gly
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
385                 390                 395                 400

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
                405                 410                 415

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

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
         435                 440                 445

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
450                 455                 460

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
465                 470                 475                 480

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
                485                 490                 495

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
            500                 505                 510

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

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

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

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

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
580                 585                 590

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

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
610                 615                 620
```

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

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

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

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
690 695 700

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715

<210> 15
<211> 301
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu (71-254) -CL

<400> 15

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 Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
195 200 205

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
210 215 220

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
225 230 235 240

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
245 250 255

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
260 265 270

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
275 280 285

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
290 295 300

<210> 16
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH FAP(28H1)

<400> 16

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL FAP(28H1)

<400> 17

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 Arg Ser
20 25 30

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

Ile Ile Gly Ala Ser Thr 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 Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 18
<211> 446
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ojal de Fc cadena pesada FAP(28H1)

<400> 18

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50                  55                  60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130                 135                 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270
```

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

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

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

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

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
340 345 350

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

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 19
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera FAP(28H1)

<400> 19

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 Arg Ser
20 25 30

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

Ile Ile Gly Ala Ser Thr 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 Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro 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> 20
<211> 760
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala Val
1 5 10 15

Leu Ala Leu Leu Val Met Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val His
20 25 30

Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
35 40 45

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

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn Asn Ile Val Leu Tyr Asn

65 70 75 80

Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu Ser Asn Arg Thr Met Lys
85 90 95

Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val
100 105 110

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
115 120 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Asn
130 135 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
145 150 155 160

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

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn Gly Arg Glu Asn Lys Ile
180 185 190

Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
195 200 205

Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Ala
210 215 220

Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225 230 235 240

Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
245 250 255

Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile Ile Asp Thr Thr Tyr Pro
260 265 270

Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val Pro Ala Met Ile Ala Ser
275 280 285

Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Thr Asp Glu Arg Val
290 295 300

Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305 310 315 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp Asp Cys Pro Lys Thr Gln
325 330 335

```
Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
            340                 345                 350

Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
        355                 360                 365

Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
370                 375                 380

Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Asn Ile
385                 390                 395                 400

Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
                405                 410                 415

Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Ser Tyr
420                 425                 430

Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
        435                 440                 445

Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
    450                 455                 460

Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
465                 470                 475                 480

Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
                485                 490                 495

Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu Glu Ile Lys Lys Leu Glu
            500                 505                 510

Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
        515                 520                 525

Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
530                 535                 540

Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Ser Tyr
545                 550                 555                 560

Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
565                 570                 575

Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu
            580                 585                 590

Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
        595                 600                 605
```

Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
610 615 620

Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
625 630 635 640

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

Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
660 665 670

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
675 680 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
690 695 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Leu
725 730 735

Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu
740 745 750

Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
755 760

<210> 21
<211> 748
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ectodominio FAP hu+marca poly-lys+marca his6

<400> 21

Arg Pro Ser Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu
1 5 10 15

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe
20 25 30

Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn
35 40 45

Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu
50 55 60

```
Ser Asn Arg Thr Met Lys Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser
65                  70                  75                  80

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
                85                  90                  95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
100                 105                 110

Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
        115                 120                 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130                 135                 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
145                 150                 155                 160

Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
                165                 170                 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
            180                 185                 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
        195                 200                 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
    210                 215                 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile
225                 230                 235                 240

Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
245                 250                 255

Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
260                 265                 270

Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
        275                 280                 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
290                 295                 300

Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305                 310                 315                 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile
                325                 330                 335
```

```
Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
            340                 345                 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
        355                 360                 365

Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
    370                 375                 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385                 390                 395                 400

Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
                405                 410                 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr
            420                 425                 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
        435                 440                 445

Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
    450                 455                 460

Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
465                 470                 475                 480

Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
                485                 490                 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
            500                 505                 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
515                 520                 525

Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
    530                 535                 540

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
545                 550                 555                 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr
                565                 570                 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile
580                 585                 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
        595                 600                 605
```

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
705 710 715 720

His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys
725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 22
<211> 2244
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ectodominio FAP hu+marca poly-lys+marca his6

<400> 22
cgcccttcaa gagttcataa ctctgaagaa aatacaatga gagcactcac actgaaggat 60

attttaaatg gaacattttc ttataaaaca ttttttccaa actggatttc aggacaagaa 120

tatcttcatc aatctgcaga taacaatata gtactttata atattgaaac aggacaatca 180

tataccattt tgagtaatag aaccatgaaa agtgtgaatg cttcaaatta cggcttatca 240

cctgatcggc aatttgtata tctagaaagt gattattcaa agctttggag atactcttac 300

acagcaacat attacatcta tgaccttagc aatggagaat ttgtaagagg aaatgagctt 360

cctcgtccaa ttcagtattt atgctggtcg cctgttggga gtaaattagc atatgtctat 420

caaaacaata tctatttgaa acaaagacca ggagatccac cttttcaaat aacatttaat 480

ggaagagaaa ataaaatatt taatggaatc ccagactggg tttatgaaga ggaaatgctt 540

gctacaaaat atgctctctg gtggtctcct aatggaaaat ttttggcata tgcggaattt 600

aatgatacgg atataccagt tattgcctat tcctattatg gcgatgaaca atatcctaga 660

acaataaata ttccataccc aaaggctgga gctaagaatc ccgttgttcg gatatttatt 720

atcgatacca cttaccctgc gtatgtaggt ccccaggaag tgcctgttcc agcaatgata 780

gcctcaagtg attattattt cagttggctc acgtgggtta ctgatgaacg agtatgtttg 840

cagtggctaa aaagagtcca gaatgtttcg gtcctgtcta tatgtgactt cagggaagac 900

tggcagacat gggattgtcc aaagacccag gagcatatag aagaaagcag aactggatgg 960

gctggtggat tctttgtttc aacaccagtt ttcagctatg atgccatttc gtactacaaa 1020

atatttagtg acaaggatgg ctacaaacat attcactata tcaaagacac tgtggaaaat 1080

gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccataaata tattcagagt aacacaggat 1140

tcactgtttt attctagcaa tgaatttgaa gaataccctg gaagaagaaa catctacaga 1200

attagcattg gaagctatcc tccaagcaag aagtgtgtta cttgccatct aaggaaagaa 1260

aggtgccaat attacacagc aagtttcagc gactacgcca agtactatgc acttgtctgc 1320

tacggcccag gcatccccat ttccaccctt catgatggac gcactgatca agaaattaaa 1380

atcctggaag aaaacaagga attggaaaat gctttgaaaa atatccagct gcctaaagag 1440

gaaattaaga aacttgaagt agatgaaatt actttatggt acaagatgat tcttcctcct 1500

caatttgaca gatcaaagaa gtatcccttg ctaattcaag tgtatggtgg tccctgcagt 1560

cagagtgtaa ggtctgtatt tgctgttaat tggatatctt atcttgcaag taaggaaggg 1620

atggtcattg ccttggtgga tggtcgagga acagctttcc aaggtgacaa actcctctat 1680

gcagtgtatc gaaagctggg tgtttatgaa gttgaagacc agattacagc tgtcagaaaa 1740

ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaaaaa agaatagcca tatggggctg gtcctatgga 1800

ggatacgttt catcactggc ccttgcatct ggaactggtc ttttcaaatg tggtatagca 1860

gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcgtctgtct acacagagag attcatgggt 1920

ctcccaacaa aggatgataa tcttgagcac tataagaatt caactgtgat ggcaagagca 1980

gaatatttca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040

tttcaaaact cagcacagat tgctaaagct ctggttaatg cacaagtgga tttccaggca 2100

atgtggtact ctgaccagaa ccacggctta tccggcctgt ccacgaacca cttatacacc 2160

cacatgaccc acttcctaaa gcagtgtttc tctttgtcag acggcaaaaa gaaaaagaaa 2220

aagggccacc accatcacca tcac 2244

<210> 23
<211> 761
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 23

Met Lys Thr Trp Leu Lys Thr Val Phe Gly Val Thr Thr Leu Ala Ala
1 5 10 15

```
Leu Ala Leu Val Val Ile Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val Tyr
20                  25                  30

Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
35                  40                  45

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

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp Asn Ile Val Phe Tyr Asn
65                  70                  75                  80

Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu Ser Asn Ser Thr Met Lys
                85                  90                  95

Ser Val Asn Ala Thr Asp Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val
            100                 105                 110

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
115                 120                 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Gln Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Tyr
    130                 135                 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
145                 150                 155                 160

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

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Glu Asn Arg Ile
            180                 185                 190

Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
        195                 200                 205

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

Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225                 230                 235                 240

Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
                245                 250                 255

Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile Val Asp Thr Thr Tyr Pro
            260                 265                 270

His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val Pro Glu Met Ile Ala Ser
275                 280                 285
```

```
Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Ser Ser Glu Arg Val
    290                 295                 300

Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305                 310                 315                 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp Glu Cys Pro Lys Asn Gln
325                 330                 335

Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
            340                 345                 350

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
        355                 360                 365

Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
370                 375                 380

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

Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
                405                 410                 415

Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Asn Ser
420                 425                 430

Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
        435                 440                 445

Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
    450                 455                 460

Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
465                 470                 475                 480

Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
                485                 490                 495

Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val Glu Ile Lys Lys Leu Lys
            500                 505                 510

Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
        515                 520                 525

Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
530                 535                 540

Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Thr Tyr
```

545 550 555 560

Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
565 570 575

Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His Ala Val Tyr Arg Lys Leu
580 585 590

Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
595 600 605

Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
610 615 620

Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
625 630 635 640

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

Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
660 665 670

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
675 680 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
690 695 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Ile
725 730 735

Ser Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe
740 745 750

Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
755 760

<210> 24
<211> 749
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ectodominio FAP mu+marca poly-lys+marca his6

<400> 24

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

```
Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Tyr Phe
            20                  25                  30

Pro Asn Trp Ile Ser Glu Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp
35                  40                  45

Asn Ile Val Phe Tyr Asn Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu
50                  55                  60

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

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
                85                  90                  95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Gln Asn Gly
100                 105                 110

Glu Phe Val Arg Gly Tyr Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
        115                 120                 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130                 135                 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr
145                 150                 155                 160

Gly Arg Glu Asn Arg Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
                165                 170                 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly
            180                 185                 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Val Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile
        195                 200                 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
    210                 215                 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile
225                 230                 235                 240

Val Asp Thr Thr Tyr Pro His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val
245                 250                 255

Pro Glu Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
            260                 265                 270

Val Ser Ser Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
```

275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp
290 295 300

Glu Cys Pro Lys Asn Gln Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305 310 315 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr
325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
340 345 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
355 360 365

Trp Glu Ala Ile Tyr Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Asn Ser Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
405 410 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys
420 425 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser
435 440 445

Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu
450 455 460

Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val
465 470 475 480

Glu Ile Lys Lys Leu Lys Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met
485 490 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
500 505 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala
515 520 525

Val Asn Trp Ile Thr Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala
530 535 540

```
Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His
545                 550                 555                 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr
565                 570                 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile
580                 585                 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595                 600                 605

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610                 615                 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly
625                 630                 635                 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
                645                 650                 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
            660                 665                 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675                 680                 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690                 695                 700

Asp Gln Asn His Gly Ile Leu Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr
705                 710                 715                 720

Thr His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly
                725                 730                 735

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740                 745
```

<210> 25
<211> 2247
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ectodominio FAP mu+marca poly-lys+marca his6

<400> 25

```
cgtccctcaa gagtttacaa acctgaagga aacacaaaga gagctcttac cttgaaggat       60

attttaaatg gaacattctc atataaaaca tattttccca actggatttc agaacaagaa      120

tatcttcatc aatctgagga tgataacata gtattttata atattgaaac aagagaatca      180
```

tatatcattt tgagtaatag caccatgaaa agtgtgaatg ctacagatta tggtttgtca 240

cctgatcggc aatttgtgta tctagaaagt gattattcaa agctctggcg atattcatac 300

acagcgacat actacatcta cgaccttcag aatggggaat ttgtaagagg atacgagctc 360

cctcgtccaa ttcagtatct atgctggtcg cctgttggga gtaaattagc atatgtatat 420

caaaacaata tttatttgaa acaaagacca ggagatccac cttttcaaat aacttatact 480

ggaagagaaa atagaatatt taatggaata ccagactggg tttatgaaga ggaaatgctt 540

gccacaaaat atgctctttg gtggtctcca gatggaaaat ttttggcata tgtagaattt 600

aatgattcag atataccaat tattgcctat tcttattatg gtgatggaca gtatcctaga 660

actataaata ttccatatcc aaaggctggg gctaagaatc cggttgttcg tgtttttatt 720

gttgacacca cctaccctca ccacgtgggc ccaatggaag tgccagttcc agaaatgata 780

gcctcaagtg actattattt cagctggctc acatgggtgt ccagtgaacg agtatgcttg 840

cagtggctaa aaagagtgca gaatgtctca gtcctgtcta tatgtgattt cagggaagac 900

tggcatgcat gggaatgtcc aaagaaccag gagcatgtag aagaaagcag aacaggatgg 960

gctggtggat tctttgtttc gacaccagct tttagccagg atgccacttc ttactacaaa 1020

atatttagcg acaaggatgg ttacaaacat attcactaca tcaaagacac tgtggaaaat 1080

gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccatatata tattccgcgt aacacaggat 1140

tcactgtttt attctagcaa tgaatttgaa ggttaccctg gaagaagaaa catctacaga 1200

attagcattg gaaactctcc tccgagcaag aagtgtgtta cttgccatct aaggaaagaa 1260

aggtgccaat attacacagc aagtttcagc tacaaagcca agtactatgc actcgtctgc 1320

tatggccctg gcctccccat ttccaccctc catgatggcc gcacagacca agaaatacaa 1380

gtattagaag aaaacaaaga actggaaaat tctctgagaa atatccagct gcctaaagtg 1440

gagattaaga agctcaaaga cgggggactg actttctggt acaagatgat tctgcctcct 1500

cagtttgaca gatcaaagaa gtacccttttg ctaattcaag tgtatggtgg tccttgtagc 1560

cagagtgtta agtctgtgtt tgctgttaat tggataactt atctcgcaag taaggagggg 1620

atagtcattg ccctggtaga tggtcggggc actgctttcc aaggtgacaa attcctgcat 1680

gccgtgtatc gaaaactggg tgtatatgaa gttgaggacc agctcacagc tgtcagaaaa 1740

ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaagaa agaatagcca tatggggctg gtcctacgga 1800

ggttatgttt catccctggc ccttgcatct ggaactggtc ttttcaaatg tggcatagca 1860

gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcatctatct actcagagag attcatgggc 1920

ctcccaacaa aggacgacaa tctcgaacac tataaaaatt caactgtgat ggcaagagca 1980

gaatatttca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040

tttcagaact cagcacagat tgctaaagct ttggttaatg cacaagtgga tttccaggcg 2100

atgtggtact ctgaccagaa ccatggtata ttatctgggc gctcccagaa tcatttatat 2160

acccacatga cgcacttcct caagcaatgc ttttctttat cagacggcaa aaagaaaaag 2220

aaaaagggcc accaccatca ccatcac 2247

<210> 26
<211> 748
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ectodominio FAP cy+marca poly-lys+marca his6

<400> 26

Arg Pro Pro Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu
1 5 10 15

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe
20 25 30

Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn
35 40 45

Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu
50 55 60

Ser Asn Arg Thr Met Lys Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser
65 70 75 80

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
85 90 95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
100 105 110

Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
115 120 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130 135 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
145 150 155 160

Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
165 170 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
180 185 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
195 200 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile

```
    210                 215                 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Phe Val Arg Ile Phe Ile
225                 230                 235                 240

Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
245                 250                 255

Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
260                 265                 270

Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
        275                 280                 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
290                 295                 300

Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305                 310                 315                 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile
                325                 330                 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
            340                 345                 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
        355                 360                 365

Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
    370                 375                 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Asp Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385                 390                 395                 400

Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
                405                 410                 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr
            420                 425                 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
        435                 440                 445

Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
    450                 455                 460

Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
465                 470                 475                 480
```

```
Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
                485                 490                 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
            500                 505                 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
515                 520                 525

Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
    530                 535                 540

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
545                 550                 555                 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr
                565                 570                 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile
580                 585                 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
        595                 600                 605

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
    610                 615                 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly
625                 630                 635                 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
                645                 650                 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
            660                 665                 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675                 680                 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690                 695                 700

Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
705                 710                 715                 720

His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys
                725                 730                 735

Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740                 745
```

<210> 27
<211> 2244
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ectodominio FAP cy+marca poly-lys+marca his6

<400> 27
cgccctccaa gagttcataa ctctgaagaa aatacaatga gagcactcac actgaaggat 60

attttaaatg ggacattttc ttataaaaca ttttttccaa actggatttc aggacaagaa 120

tatcttcatc aatctgcaga taacaatata gtactttata atattgaaac aggacaatca 180

tataccattt tgagtaacag aaccatgaaa agtgtgaatg cttcaaatta tggcttatca 240

cctgatcggc aatttgtata tctagaaagt gattattcaa agctttggag atactcttac 300

acagcaacat attacatcta tgaccttagc aatggagaat ttgtaagagg aaatgagctt 360

cctcgtccaa ttcagtattt atgctggtcg cctgttggga gtaaattagc atatgtctat 420

caaaacaata tctatttgaa acaaagacca ggagatccac cttttcaaat aacatttaat 480

ggaagagaaa ataaaatatt taatggaatc ccagactggg tttatgaaga ggaaatgctt 540

gctacaaaat atgctctctg gtggtctcct aatggaaaat ttttggcata tgcggaattt 600

aatgatacag atataccagt tattgcctat tcctattatg gcgatgaaca atatcccaga 660

acaataaata ttccataccc aaaggccgga gctaagaatc cttttgttcg gatatttatt 720

atcgatacca cttaccctgc gtatgtaggt ccccaggaag tgcctgttcc agcaatgata 780

gcctcaagtg attattattt cagttggctc acgtgggtta ctgatgaacg agtatgtttg 840

cagtggctaa aaagagtcca gaatgtttcg gtcttgtcta tatgtgattt cagggaagac 900

tggcagacat gggattgtcc aaagacccag gagcatatag aagaaagcag aactggatgg 960

gctggtggat tctttgtttc aacaccagtt ttcagctatg atgccatttc atactacaaa 1020

atatttagtg acaaggatgg ctacaaacat attcactata tcaaagacac tgtggaaaat 1080

gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccataaata tattcagagt aacacaggat 1140

tcactgtttt attctagcaa tgaatttgaa gattaccctg gaagaagaaa catctacaga 1200

attagcattg gaagctatcc tccaagcaag aagtgtgtta cttgccatct aaggaaagaa 1260

aggtgccaat attacacagc aagtttcagc gactacgcca agtactatgc acttgtctgc 1320

tatggcccag gcatccccat ttccaccctt catgacggac gcactgatca agaaattaaa 1380

atcctggaag aaaacaagga attggaaaat gctttgaaaa atatccagct gcctaaagag 1440

gaaattaaga aacttgaagt agatgaaatt actttatggt acaagatgat tcttcctcct 1500

caatttgaca gatcaaagaa gtatcccttg ctaattcaag tgtatggtgg tccctgcagt 1560

cagagtgtaa ggtctgtatt tgctgttaat tggatatctt atcttgcaag taaggaaggg 1620

atggtcattg ccttggtgga tggtcgggga acagctttcc aaggtgacaa actcctgtat 1680

gcagtgtatc gaaagctggg tgtttatgaa gttgaagacc agattacagc tgtcagaaaa 1740

ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaaaaa agaatagcca tatggggctg gtcctatgga 1800

ggatatgttt catcactggc ccttgcatct ggaactggtc ttttcaaatg tgggatagca 1860

gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcgtctgtct acacagagag attcatgggt 1920

ctcccaacaa aggatgataa tcttgagcac tataagaatt caactgtgat ggcaagagca 1980

gaatatttca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040

tttcaaaact cagcacagat tgctaaagct ctggttaatg cacaagtgga tttccaggca 2100

atgtggtact ctgaccagaa ccacggctta tccggcctgt ccacgaacca cttatacacc 2160

cacatgaccc acttcctaaa gcagtgtttc tctttgtcag acggcaaaaa gaaaaagaaa 2220

aagggccacc accatcacca tcac 2244

<210> 28
<211> 702
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20 25 30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly
50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile
65 70 75 80

Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser
85 90 95

Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile
100 105 110

Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp
115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu
130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys
145 150 155 160

```
Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr
165                 170                 175

Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
180                 185                 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg
    210                 215                 220

Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
225                 230                 235                 240

Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn
                245                 250                 255

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe
            260                 265                 270

Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
        275                 280                 285

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser
    290                 295                 300

Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu
                325                 330                 335

Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr
            340                 345                 350

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
355                 360                 365

Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
370                 375                 380

Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Lys Leu Ser
385                 390                 395                 400

Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
                405                 410                 415

Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn
420                 425                 430
```

```
Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser
435                 440                 445

Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile
    450                 455                 460

Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn
465                 470                 475                 480

Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val
485                 490                 495

Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro
            500                 505                 510

Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln
        515                 520                 525

Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser
530                 535                 540

Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn
545                 550                 555                 560

Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser
565                 570                 575

Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly
580                 585                 590

Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly
        595                 600                 605

Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln
610                 615                 620

Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu
625                 630                 635                 640

Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe
645                 650                 655

Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile
            660                 665                 670

Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr
675                 680                 685

Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
    690                 695                 700
```

<210> 29
<211> 2322
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Gln Ser Gly Pro Arg Pro Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ala Leu Thr Leu Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala Ala Ser Phe
20 25 30

Phe Gly Glu Asn His Leu Glu Val Pro Val Ala Thr Ala Leu Thr Asp
35 40 45

Ile Asp Leu Gln Leu Gln Phe Ser Thr Ser Gln Pro Glu Ala Leu Leu
50 55 60

Leu Leu Ala Ala Gly Pro Ala Asp His Leu Leu Leu Gln Leu Tyr Ser
65 70 75 80

Gly Arg Leu Gln Val Arg Leu Val Leu Gly Gln Glu Glu Leu Arg Leu
85 90 95

Gln Thr Pro Ala Glu Thr Leu Leu Ser Asp Ser Ile Pro His Thr Val
100 105 110

Val Leu Thr Val Val Glu Gly Trp Ala Thr Leu Ser Val Asp Gly Phe
115 120 125

Leu Asn Ala Ser Ser Ala Val Pro Gly Ala Pro Leu Glu Val Pro Tyr
130 135 140

Gly Leu Phe Val Gly Gly Thr Gly Thr Leu Gly Leu Pro Tyr Leu Arg
145 150 155 160

Gly Thr Ser Arg Pro Leu Arg Gly Cys Leu His Ala Ala Thr Leu Asn
165 170 175

Gly Arg Ser Leu Leu Arg Pro Leu Thr Pro Asp Val His Glu Gly Cys
180 185 190

Ala Glu Glu Phe Ser Ala Ser Asp Asp Val Ala Leu Gly Phe Ser Gly
195 200 205

Pro His Ser Leu Ala Ala Phe Pro Ala Trp Gly Thr Gln Asp Glu Gly
210 215 220

Thr Leu Glu Phe Thr Leu Thr Thr Gln Ser Arg Gln Ala Pro Leu Ala
225 230 235 240

```
Phe Gln Ala Gly Gly Arg Arg Gly Asp Phe Ile Tyr Val Asp Ile Phe
                245                 250                 255

Glu Gly His Leu Arg Ala Val Val Glu Lys Gly Gln Gly Thr Val Leu
            260                 265                 270

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

Val His Ile Asn Ala His Arg Leu Glu Ile Ser Val Asp Gln Tyr Pro
290                 295                 300

Thr His Thr Ser Asn Arg Gly Val Leu Ser Tyr Leu Glu Pro Arg Gly
305                 310                 315                 320

Ser Leu Leu Leu Gly Gly Leu Asp Ala Glu Ala Ser Arg His Leu Gln
                325                 330                 335

Glu His Arg Leu Gly Leu Thr Pro Glu Ala Thr Asn Ala Ser Leu Leu
            340                 345                 350

Gly Cys Met Glu Asp Leu Ser Val Asn Gly Gln Arg Arg Gly Leu Arg
        355                 360                 365

Glu Ala Leu Leu Thr Arg Asn Met Ala Ala Gly Cys Arg Leu Glu Glu
370                 375                 380

Glu Glu Tyr Glu Asp Asp Ala Tyr Gly His Tyr Glu Ala Phe Ser Thr
385                 390                 395                 400

Leu Ala Pro Glu Ala Trp Pro Ala Met Glu Leu Pro Glu Pro Cys Val
                405                 410                 415

Pro Glu Pro Gly Leu Pro Pro Val Phe Ala Asn Phe Thr Gln Leu Leu
            420                 425                 430

Thr Ile Ser Pro Leu Val Val Ala Glu Gly Gly Thr Ala Trp Leu Glu
        435                 440                 445

Trp Arg His Val Gln Pro Thr Leu Asp Leu Met Glu Ala Glu Leu Arg
450                 455                 460

Lys Ser Gln Val Leu Phe Ser Val Thr Arg Gly Ala Arg His Gly Glu
465                 470                 475                 480

Leu Glu Leu Asp Ile Pro Gly Ala Gln Ala Arg Lys Met Phe Thr Leu
                485                 490                 495

Leu Asp Val Val Asn Arg Lys Ala Arg Phe Ile His Asp Gly Ser Glu
```

```
500                 505                 510

Asp Thr Ser Asp Gln Leu Val Leu Glu Val Ser Val Thr Ala Arg Val
515                 520                 525

Pro Met Pro Ser Cys Leu Arg Arg Gly Gln Thr Tyr Leu Leu Pro Ile
    530                 535                 540

Gln Val Asn Pro Val Asn Asp Pro Pro His Ile Ile Phe Pro His Gly
545                 550                 555                 560

Ser Leu Met Val Ile Leu Glu His Thr Gln Lys Pro Leu Gly Pro Glu
                565                 570                 575

Val Phe Gln Ala Tyr Asp Pro Asp Ser Ala Cys Glu Gly Leu Thr Phe
            580                 585                 590

Gln Val Leu Gly Thr Ser Ser Gly Leu Pro Val Glu Arg Arg Asp Gln
        595                 600                 605

Pro Gly Glu Pro Ala Thr Glu Phe Ser Cys Arg Glu Leu Glu Ala Gly
    610                 615                 620

Ser Leu Val Tyr Val His Arg Gly Gly Pro Ala Gln Asp Leu Thr Phe
625                 630                 635                 640

Arg Val Ser Asp Gly Leu Gln Ala Ser Pro Pro Ala Thr Leu Lys Val
                645                 650                 655

Val Ala Ile Arg Pro Ala Ile Gln Ile His Arg Ser Thr Gly Leu Arg
660                 665                 670

Leu Ala Gln Gly Ser Ala Met Pro Ile Leu Pro Ala Asn Leu Ser Val
        675                 680                 685

Glu Thr Asn Ala Val Gly Gln Asp Val Ser Val Leu Phe Arg Val Thr
    690                 695                 700

Gly Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Gln Lys Gln Gly Ala Gly Gly Val
705                 710                 715                 720

Glu Gly Ala Glu Trp Trp Ala Thr Gln Ala Phe His Gln Arg Asp Val
725                 730                 735

Glu Gln Gly Arg Val Arg Tyr Leu Ser Thr Asp Pro Gln His His Ala
            740                 745                 750

Tyr Asp Thr Val Glu Asn Leu Ala Leu Glu Val Gln Val Gly Gln Glu
755                 760                 765
```

```
Ile Leu Ser Asn Leu Ser Phe Pro Val Thr Ile Gln Arg Ala Thr Val
    770                 775                 780

Trp Met Leu Arg Leu Glu Pro Leu His Thr Gln Asn Thr Gln Gln Glu
785                 790                 795                 800

Thr Leu Thr Thr Ala His Leu Glu Ala Thr Leu Glu Glu Ala Gly Pro
805                 810                 815

Ser Pro Pro Thr Phe His Tyr Glu Val Val Gln Ala Pro Arg Lys Gly
            820                 825                 830

Asn Leu Gln Leu Gln Gly Thr Arg Leu Ser Asp Gly Gln Gly Phe Thr
        835                 840                 845

Gln Asp Asp Ile Gln Ala Gly Arg Val Thr Tyr Gly Ala Thr Ala Arg
    850                 855                 860

Ala Ser Glu Ala Val Glu Asp Thr Phe Arg Phe Arg Val Thr Ala Pro
865                 870                 875                 880

Pro Tyr Phe Ser Pro Leu Tyr Thr Phe Pro Ile His Ile Gly Gly Asp
                885                 890                 895

Pro Asp Ala Pro Val Leu Thr Asn Val Leu Leu Val Val Pro Glu Gly
            900                 905                 910

Gly Glu Gly Val Leu Ser Ala Asp His Leu Phe Val Lys Ser Leu Asn
        915                 920                 925

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Glu Val Met Glu Arg Pro Arg His Gly Arg
930                 935                 940

Leu Ala Trp Arg Gly Thr Gln Asp Lys Thr Thr Met Val Thr Ser Phe
945                 950                 955                 960

Thr Asn Glu Asp Leu Leu Arg Gly Arg Leu Val Tyr Gln His Asp Asp
                965                 970                 975

Ser Glu Thr Thr Glu Asp Asp Ile Pro Phe Val Ala Thr Arg Gln Gly
980                 985                 990

Glu Ser Ser Gly Asp Met Ala Trp  Glu Glu Val Arg Gly  Val Phe Arg
995                 1000                1005

Val Ala  Ile Gln Pro Val Asn  Asp His Ala Pro Val  Gln Thr Ile
    1010                1015                1020

Ser Arg  Ile Phe His Val Ala  Arg Gly Gly Arg Arg  Leu Leu Thr
1025                1030                1035
```

```
Thr Asp  Asp Val Ala Phe Ser  Asp Ala Asp Ser Gly  Phe Ala Asp
1040                1045                1050

Ala Gln  Leu Val Leu Thr Arg  Lys Asp Leu Leu Phe  Gly Ser Ile
1055                1060                1065

Val Ala  Val Asp Glu Pro Thr  Arg Pro Ile Tyr Arg  Phe Thr Gln
1070                1075                1080

Glu Asp  Leu Arg Lys Arg Arg  Val Leu Phe Val His  Ser Gly Ala
    1085                1090                1095

Asp Arg  Gly Trp Ile Gln Leu  Gln Val Ser Asp Gly  Gln His Gln
1100                1105                1110

Ala Thr  Ala Leu Leu Glu Val  Gln Ala Ser Glu Pro  Tyr Leu Arg
    1115                1120                1125

Val Ala  Asn Gly Ser Ser Leu  Val Val Pro Gln Gly  Gly Gln Gly
1130                1135                1140

Thr Ile  Asp Thr Ala Val Leu  His Leu Asp Thr Asn  Leu Asp Ile
1145                1150                1155

Arg Ser  Gly Asp Glu Val His  Tyr His Val Thr Ala  Gly Pro Arg
    1160                1165                1170

Trp Gly  Gln Leu Val Arg Ala  Gly Gln Pro Ala Thr  Ala Phe Ser
    1175                1180                1185

Gln Gln  Asp Leu Leu Asp Gly  Ala Val Leu Tyr Ser  His Asn Gly
1190                1195                1200

Ser Leu  Ser Pro Arg Asp Thr  Met Ala Phe Ser Val  Glu Ala Gly
1205                1210                1215

Pro Val  His Thr Asp Ala Thr  Leu Gln Val Thr Ile  Ala Leu Glu
    1220                1225                1230

Gly Pro  Leu Ala Pro Leu Lys  Leu Val Arg His Lys  Lys Ile Tyr
1235                1240                1245

Val Phe  Gln Gly Glu Ala Ala  Glu Ile Arg Arg Asp  Gln Leu Glu
1250                1255                1260

Ala Ala  Gln Glu Ala Val Pro  Pro Ala Asp Ile Val  Phe Ser Val
    1265                1270                1275

Lys Ser  Pro Pro Ser Ala Gly  Tyr Leu Val Met Val  Ser Arg Gly
    1280                1285                1290
```

```
Ala Leu  Ala Asp Glu Pro Pro  Ser Leu Asp Pro Val  Gln Ser Phe
    1295                1300                1305

Ser Gln  Glu Ala Val Asp Thr  Gly Arg Val Leu Tyr  Leu His Ser
    1310                1315                1320

Arg Pro  Glu Ala Trp Ser Asp  Ala Phe Ser Leu Asp  Val Ala Ser
    1325                1330                1335

Gly Leu  Gly Ala Pro Leu Glu  Gly Val Leu Val Glu  Leu Glu Val
    1340                1345                1350

Leu Pro  Ala Ala Ile Pro Leu  Glu Ala Gln Asn Phe  Ser Val Pro
1355                1360                1365

Glu Gly  Gly Ser Leu Thr Leu  Ala Pro Pro Leu Leu  Arg Val Ser
    1370                1375                1380

Gly Pro  Tyr Phe Pro Thr Leu  Leu Gly Leu Ser Leu  Gln Val Leu
1385                1390                1395

Glu Pro  Pro Gln His Gly Ala  Leu Gln Lys Glu Asp  Gly Pro Gln
1400                1405                1410

Ala Arg  Thr Leu Ser Ala Phe  Ser Trp Arg Met Val  Glu Glu Gln
1415                1420                1425

Leu Ile  Arg Tyr Val His Asp  Gly Ser Glu Thr Leu  Thr Asp Ser
    1430                1435                1440

Phe Val  Leu Met Ala Asn Ala  Ser Glu Met Asp Arg  Gln Ser His
    1445                1450                1455

Pro Val  Ala Phe Thr Val Thr  Val Leu Pro Val Asn  Asp Gln Pro
    1460                1465                1470

Pro Ile  Leu Thr Thr Asn Thr  Gly Leu Gln Met Trp  Glu Gly Ala
1475                1480                1485

Thr Ala  Pro Ile Pro Ala Glu  Ala Leu Arg Ser Thr  Asp Gly Asp
    1490                1495                1500

Ser Gly  Ser Glu Asp Leu Val  Tyr Thr Ile Glu Gln  Pro Ser Asn
1505                1510                1515

Gly Arg  Val Val Leu Arg Gly  Ala Pro Gly Thr Glu  Val Arg Ser
1520                1525                1530

Phe Thr  Gln Ala Gln Leu Asp  Gly Gly Leu Val Leu  Phe Ser His
```

1535 1540 1545

Arg Gly Thr Leu Asp Gly Gly Phe Arg Phe Arg Leu Ser Asp Gly
1550 1555 1560

Glu His Thr Ser Pro Gly His Phe Phe Arg Val Thr Ala Gln Lys
1565 1570 1575

Gln Val Leu Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys
1580 1585 1590

Pro Gly Ser Val Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser
1595 1600 1605

Ser Ser Ala Gly Thr Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val
1610 1615 1620

Arg Gly Pro Gln Leu Gly Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser
1625 1630 1635

Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala
1640 1645 1650

Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu Met Pro Pro Glu Pro Phe Trp
1655 1660 1665

Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln Leu Ser Ser Pro Pro Ala
1670 1675 1680

Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala Val Ser Phe Glu Ala
1685 1690 1695

Ala Cys Pro Gln Arg Pro Ser His Leu Trp Lys Asn Lys Gly Leu
1700 1705 1710

Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Arg Ile Thr Val Ala Ala Leu
1715 1720 1725

Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln Arg Ser
1730 1735 1740

Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg Gly
1745 1750 1755

Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His
1760 1765 1770

Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His
1775 1780 1785

```
Gly Gly  Gly Gly Thr Gln Gln  Asp Gly Phe His Phe  Arg Ala His
1790                 1795                 1800

Leu Gln  Gly Pro Ala Gly Ala  Ser Val Ala Gly Pro  Gln Thr Ser
    1805                 1810                 1815

Glu Ala  Phe Ala Ile Thr Val  Arg Asp Val Asn Glu  Arg Pro Pro
1820                 1825                 1830

Gln Pro  Gln Ala Ser Val Pro  Leu Arg Leu Thr Arg  Gly Ser Arg
    1835                 1840                 1845

Ala Pro  Ile Ser Arg Ala Gln  Leu Ser Val Val Asp  Pro Asp Ser
1850                 1855                 1860

Ala Pro  Gly Glu Ile Glu Tyr  Glu Val Gln Arg Ala  Pro His Asn
    1865                 1870                 1875

Gly Phe  Leu Ser Leu Val Gly  Gly Gly Leu Gly Pro  Val Thr Arg
1880                 1885                 1890

Phe Thr  Gln Ala Asp Val Asp  Ser Gly Arg Leu Ala  Phe Val Ala
    1895                 1900                 1905

Asn Gly  Ser Ser Val Ala Gly  Ile Phe Gln Leu Ser  Met Ser Asp
    1910                 1915                 1920

Gly Ala  Ser Pro Pro Leu Pro  Met Ser Leu Ala Val  Asp Ile Leu
    1925                 1930                 1935

Pro Ser  Ala Ile Glu Val Gln  Leu Arg Ala Pro Leu  Glu Val Pro
    1940                 1945                 1950

Gln Ala  Leu Gly Arg Ser Ser  Leu Ser Gln Gln Gln  Leu Arg Val
    1955                 1960                 1965

Val Ser  Asp Arg Glu Glu Pro  Glu Ala Ala Tyr Arg  Leu Ile Gln
1970                 1975                 1980

Gly Pro  Gln Tyr Gly His Leu  Leu Val Gly Gly Arg  Pro Thr Ser
    1985                 1990                 1995

Ala Phe  Ser Gln Phe Gln Ile  Asp Gln Gly Glu Val  Val Phe Ala
    2000                 2005                 2010

Phe Thr  Asn Phe Ser Ser Ser  His Asp His Phe Arg  Val Leu Ala
2015                 2020                 2025

Leu Ala  Arg Gly Val Asn Ala  Ser Ala Val Val Asn  Val Thr Val
2030                 2035                 2040
```

```
Arg Ala  Leu Leu His Val Trp  Ala Gly Gly Pro Trp  Pro Gln Gly
    2045                2050                2055

Ala Thr  Leu Arg Leu Asp Pro  Thr Val Leu Asp Ala  Gly Glu Leu
    2060                2065                2070

Ala Asn  Arg Thr Gly Ser Val  Pro Arg Phe Arg Leu  Leu Glu Gly
    2075                2080                2085

Pro Arg  His Gly Arg Val Val  Arg Val Pro Arg Ala  Arg Thr Glu
    2090                2095                2100

Pro Gly  Gly Ser Gln Leu Val  Glu Gln Phe Thr Gln  Gln Asp Leu
    2105                2110                2115

Glu Asp  Gly Arg Leu Gly Leu  Glu Val Gly Arg Pro  Glu Gly Arg
    2120                2125                2130

Ala Pro  Gly Pro Ala Gly Asp  Ser Leu Thr Leu Glu  Leu Trp Ala
    2135                2140                2145

Gln Gly  Val Pro Pro Ala Val  Ala Ser Leu Asp Phe  Ala Thr Glu
2150                2155                2160

Pro Tyr  Asn Ala Ala Arg Pro  Tyr Ser Val Ala Leu  Leu Ser Val
    2165                2170                2175

Pro Glu  Ala Ala Arg Thr Glu  Ala Gly Lys Pro Glu  Ser Ser Thr
2180                2185                2190

Pro Thr  Gly Glu Pro Gly Pro  Met Ala Ser Ser Pro  Glu Pro Ala
2195                2200                2205

Val Ala  Lys Gly Gly Phe Leu  Ser Phe Leu Glu Ala  Asn Met Phe
2210                2215                2220

Ser Val  Ile Ile Pro Met Cys  Leu Val Leu Leu Leu  Leu Ala Leu
    2225                2230                2235

Ile Leu  Pro Leu Leu Phe Tyr  Leu Arg Lys Arg Asn  Lys Thr Gly
2240                2245                2250

Lys His  Asp Val Gln Val Leu  Thr Ala Lys Pro Arg  Asn Gly Leu
    2255                2260                2265

Ala Gly  Asp Thr Glu Thr Phe  Arg Lys Val Glu Pro  Gly Gln Ala
    2270                2275                2280

Ile Pro  Leu Thr Ala Val Pro  Gly Gln Gly Pro Pro  Pro Gly Gly
    2285                2290                2295
```

Gln Pro Asp Pro Glu Leu Leu Gln Phe Cys Arg Thr Pro Asn Pro
2300 2305 2310

Ala Leu Lys Asn Gly Gln Tyr Trp Val
2315 2320

<210> 30
<211> 1210
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
50 55 60

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

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
115 120 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
130 135 140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145 150 155 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
195 200 205

```
Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
    210                 215                 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225                 230                 235                 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
                245                 250                 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
            260                 265                 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
        275                 280                 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
    290                 295                 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305                 310                 315                 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
                325                 330                 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
            340                 345                 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
        355                 360                 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
    370                 375                 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385                 390                 395                 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
                405                 410                 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
420                 425                 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
        435                 440                 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
    450                 455                 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
```

```
465                 470                 475                 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
                485                 490                 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
            500                 505                 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
        515                 520                 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
    530                 535                 540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
545                 550                 555                 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
                565                 570                 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
            580                 585                 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
        595                 600                 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
    610                 615                 620

Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
625                 630                 635                 640

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
                645                 650                 655

Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
660                 665                 670

Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
        675                 680                 685

Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
    690                 695                 700

Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
705                 710                 715                 720

Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
725                 730                 735
```

```
Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
            740                 745                 750

Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
755                 760                 765

Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
    770                 775                 780

Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
785                 790                 795                 800

Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
                805                 810                 815

Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
            820                 825                 830

Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
        835                 840                 845

Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
    850                 855                 860

Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
865                 870                 875                 880

Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
                885                 890                 895

Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
900                 905                 910

Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
915                 920                 925

Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
    930                 935                 940

Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
945                 950                 955                 960

Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
                965                 970                 975

Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
980                 985                 990

Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala  Leu Met Asp Glu Glu  Asp Met Asp
        995                 1000                1005
```

```
Asp Val  Val Asp Ala Asp Glu  Tyr Leu Ile Pro Gln  Gln Gly Phe
    1010                1015                1020

Phe Ser  Ser Pro Ser Thr Ser  Arg Thr Pro Leu Leu  Ser Ser Leu
1025                1030                1035

Ser Ala  Thr Ser Asn Asn Ser  Thr Val Ala Cys Ile  Asp Arg Asn
    1040                1045                1050

Gly Leu  Gln Ser Cys Pro Ile  Lys Glu Asp Ser Phe  Leu Gln Arg
    1055                1060                1065

Tyr Ser  Ser Asp Pro Thr Gly  Ala Leu Thr Glu Asp  Ser Ile Asp
1070                1075                1080

Asp Thr  Phe Leu Pro Val Pro  Glu Tyr Ile Asn Gln  Ser Val Pro
    1085                1090                1095

Lys Arg  Pro Ala Gly Ser Val  Gln Asn Pro Val Tyr  His Asn Gln
1100                1105                1110

Pro Leu  Asn Pro Ala Pro Ser  Arg Asp Pro His Tyr  Gln Asp Pro
    1115                1120                1125

His Ser  Thr Ala Val Gly Asn  Pro Glu Tyr Leu Asn  Thr Val Gln
    1130                1135                1140

Pro Thr  Cys Val Asn Ser Thr  Phe Asp Ser Pro Ala  His Trp Ala
    1145                1150                1155

Gln Lys  Gly Ser His Gln Ile  Ser Leu Asp Asn Pro  Asp Tyr Gln
    1160                1165                1170

Gln Asp  Phe Phe Pro Lys Glu  Ala Lys Pro Asn Gly  Ile Phe Lys
1175                1180                1185

Gly Ser  Thr Ala Glu Asn Ala  Glu Tyr Leu Arg Val  Ala Pro Gln
1190                1195                1200

Ser Ser  Glu Phe Ile Gly Ala
1205                1210
```

<210> 31
<211> 556
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

```
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

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

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 Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
```

545 550 555

<210> 32
<211> 297
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

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> 33
<211> 364
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln
20 25 30

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro
35 40 45

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

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

Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro
85 90 95

Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp
100 105 110

Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser
115 120 125

Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg
130 135 140

Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn
145 150 155 160

Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile

165 170 175

Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr
180 185 190

His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr
195 200 205

Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu
210 215 220

Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr
225 230 235 240

Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly
245 250 255

Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala
260 265 270

Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys
275 280 285

Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly
290 295 300

Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr
305 310 315 320

Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu
325 330 335

Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys
340 345 350

Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln
355 360

<210> 34
<211> 205
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Met Thr Pro Pro Glu Arg Leu Phe Leu Pro Arg Val Cys Gly Thr Thr
1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Leu Val Leu Leu Pro Gly Ala
20 25 30

Gln Gly Leu Pro Gly Val Gly Leu Thr Pro Ser Ala Ala Gln Thr Ala

35 40 45

Arg Gln His Pro Lys Met His Leu Ala His Ser Thr Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Ala His Leu Ile Gly Asp Pro Ser Lys Gln Asn Ser Leu Leu Trp Arg
65 70 75 80

Ala Asn Thr Asp Arg Ala Phe Leu Gln Asp Gly Phe Ser Leu Ser Asn
85 90 95

Asn Ser Leu Leu Val Pro Thr Ser Gly Ile Tyr Phe Val Tyr Ser Gln
100 105 110

Val Val Phe Ser Gly Lys Ala Tyr Ser Pro Lys Ala Thr Ser Ser Pro
115 120 125

Leu Tyr Leu Ala His Glu Val Gln Leu Phe Ser Ser Gln Tyr Pro Phe
130 135 140

His Val Pro Leu Leu Ser Ser Gln Lys Met Val Tyr Pro Gly Leu Gln
145 150 155 160

Glu Pro Trp Leu His Ser Met Tyr His Gly Ala Ala Phe Gln Leu Thr
165 170 175

Gln Gly Asp Gln Leu Ser Thr His Thr Asp Gly Ile Pro His Leu Val
180 185 190

Leu Ser Pro Ser Thr Val Phe Phe Gly Ala Phe Ala Leu
195 200 205

<210> 35
<211> 233
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
35 40 45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
50 55 60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser

65 70 75 80

Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
85 90 95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
100 105 110

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

Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
130 135 140

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
145 150 155 160

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
165 170 175

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
180 185 190

Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
195 200 205

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
225 230

<210> 36
<211> 244
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Gly Ala Leu Gly Leu Glu Gly Arg Gly Gly Arg Leu Gln Gly Arg
1 5 10 15

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

Leu Leu Ala Val Pro Ile Thr Val Leu Ala Val Leu Ala Leu Val Pro
35 40 45

Gln Asp Gln Gly Gly Leu Val Thr Glu Thr Ala Asp Pro Gly Ala Gln
50 55 60

Ala Gln Gln Gly Leu Gly Phe Gln Lys Leu Pro Glu Glu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Thr Asp Leu Ser Pro Gly Leu Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Ala Pro
85 90 95

Leu Lys Gly Gln Gly Leu Gly Trp Glu Thr Thr Lys Glu Gln Ala Phe
100 105 110

Leu Thr Ser Gly Thr Gln Phe Ser Asp Ala Glu Gly Leu Ala Leu Pro
115 120 125

Gln Asp Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Leu Val Gly Tyr Arg Gly Arg
130 135 140

Ala Pro Pro Gly Gly Gly Asp Pro Gln Gly Arg Ser Val Thr Leu Arg
145 150 155 160

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

Leu Leu Leu Glu Gly Ala Glu Thr Val Thr Pro Val Leu Asp Pro Ala
180 185 190

Arg Arg Gln Gly Tyr Gly Pro Leu Trp Tyr Thr Ser Val Gly Phe Gly
195 200 205

Gly Leu Val Gln Leu Arg Arg Gly Glu Arg Val Tyr Val Asn Ile Ser
210 215 220

His Pro Asp Met Val Asp Phe Ala Arg Gly Lys Thr Phe Phe Gly Ala
225 230 235 240

Val Met Val Gly

<210> 37
<211> 183
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val

50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
85 90 95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
100 105 110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
115 120 125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
130 135 140

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145 150 155 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
165 170 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
180

<210> 38
<211> 261
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu

100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 39
<211> 281
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val Asp
1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu Pro Cys
20 25 30

Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro
35 40 45

Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro
50 55 60

Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Lys Lys Arg Gly Asn His Ser Thr Gly

65 70 75 80

Leu Cys Leu Leu Val Met Phe Phe Met Val Leu Val Ala Leu Val Gly
85 90 95

Leu Gly Leu Gly Met Phe Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala
100 105 110

Glu Leu Arg Glu Ser Thr Ser Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu
115 120 125

Lys Gln Ile Gly His Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg
130 135 140

Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu
145 150 155 160

Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr
165 170 175

Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr
180 185 190

Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser
195 200 205

His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met
210 215 220

Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala
225 230 235 240

Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His
245 250 255

Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser
260 265 270

Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu
275 280

<210> 40
<211> 193
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly
1 5 10 15

Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile

20 25 30

Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu
35 40 45

Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His
50 55 60

Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala
65 70 75 80

Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu
85 90 95

Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu
100 105 110

Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu
115 120 125

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

Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro
145 150 155 160

Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
165 170 175

Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
180 185 190

Pro

<210> 41
<211> 234
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Asp Pro Gly Leu Gln Gln Ala Leu Asn Gly Met Ala Pro Pro Gly
1 5 10 15

Asp Thr Ala Met His Val Pro Ala Gly Ser Val Ala Ser His Leu Gly
20 25 30

Thr Thr Ser Arg Ser Tyr Phe Tyr Leu Thr Thr Ala Thr Leu Ala Leu
35 40 45

Cys Leu Val Phe Thr Val Ala Thr Ile Met Val Leu Val Val Gln Arg

50 55 60

Thr Asp Ser Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys Gly Gly
65 70 75 80

Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro Phe Lys
85 90 95

Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys Thr Lys
100 105 110

Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln Asp
115 120 125

Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys Gln
130 135 140

Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu Lys Leu
145 150 155 160

Glu Leu Leu Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val Thr Val
165 170 175

Cys Glu Ser Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu Ser Gln
180 185 190

Phe Leu Leu Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val Asn Val
195 200 205

Asp Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Val
210 215 220

Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp
225 230

<210> 42
<211> 254
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

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 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

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> 43
<211> 281
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

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

Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala
20 25 30

Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys

```
         35                  40                  45

Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr
    50                  55                  60

Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val
65                  70                  75                  80

Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser
                85                  90                  95

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
100                 105                 110

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

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
    130                 135                 140

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
145                 150                 155                 160

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
165                 170                 175

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
195                 200                 205

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
210                 215                 220

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
225                 230                 235                 240

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
245                 250                 255

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
            260                 265                 270

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
        275                 280

<210>  44
<211>  317
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
```

<400> 44

```
Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser Glu
1               5                  10                  15

Glu Met Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu His Ala
            20                  25                  30

Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met
        35                  40                  45

Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Val
    50                  55                  60

Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn
                85                  90                  95

Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile
            100                 105                 110

Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln
        115                 120                 125

Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys
130                 135                 140

Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu
145                 150                 155                 160

Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro
                165                 170                 175

Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
            180                 185                 190

Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val
        195                 200                 205

Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
    210                 215                 220

His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val
225                 230                 235                 240

Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met
                245                 250                 255
```

Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
260 265 270

Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu
275 280 285

Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp
290 295 300

Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp
305 310 315

<210> 45
<211> 249
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Ala Ala Arg Arg Ser Gln Arg Arg Arg Gly Arg Arg Gly Glu Pro
1 5 10 15

Gly Thr Ala Leu Leu Val Pro Leu Ala Leu Gly Leu Gly Leu Ala Leu
20 25 30

Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu Ala Val Val Ser Leu Gly Ser Arg Ala
35 40 45

Ser Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ala Gln Glu Glu Leu Val Ala Glu Glu
50 55 60

Asp Gln Asp Pro Ser Glu Leu Asn Pro Gln Thr Glu Glu Ser Gln Asp
65 70 75 80

Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu Val Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu
100 105 110

Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly
115 120 125

Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Ala Arg Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu
130 135 140

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

Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr
165 170 175

```
Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu
180                 185                 190

Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg
        195                 200                 205

Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu
210                 215                 220

Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu
225                 230                 235                 240

Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His
                245
```

<210> 46
<211> 250
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

```
Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly
1               5                   10                  15

Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp
20                  25                  30

Leu Ser Trp Gly Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Cys Ala Met Ala Leu
        35                  40                  45

Leu Thr Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg
50                  55                  60

Leu Gln Gly Thr Gly Gly Pro Ser Gln Asn Gly Glu Gly Tyr Pro Trp
65                  70                  75                  80

Gln Ser Leu Pro Glu Gln Ser Ser Asp Ala Leu Glu Ala Trp Glu Asn
85                  90                  95

Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys
            100                 105                 110

Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys
        115                 120                 125

Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg
    130                 135                 140

Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala
145                 150                 155                 160
```

```
Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe
                165                 170                 175

Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr
180                 185                 190

Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr
        195                 200                 205

Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile
210                 215                 220

Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro
225                 230                 235                 240

His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu
                245                 250
```

<210> 47
<211> 285
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

```
Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
1               5                   10                  15

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

Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
35                  40                  45

Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
50                  55                  60

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

Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
                85                  90                  95

Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
            100                 105                 110

Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
        115                 120                 125

Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln
    130                 135                 140
```

```
Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys
145                 150                 155                 160

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

Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr
            180                 185                 190

Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
        195                 200                 205

Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu
210                 215                 220

Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
225                 230                 235                 240

Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly
                245                 250                 255

Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu
            260                 265                 270

Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
275                 280                 285
```

<210> 48
<211> 240
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

```
Met Glu Glu Ser Val Val Arg Pro Ser Val Phe Val Val Asp Gly Gln
1               5                   10                  15

Thr Asp Ile Pro Phe Thr Arg Leu Gly Arg Ser His Arg Arg Gln Ser
20                  25                  30

Cys Ser Val Ala Arg Val Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Met Gly
        35                  40                  45

Ala Gly Leu Ala Val Gln Gly Trp Phe Leu Leu Gln Leu His Trp Arg
    50                  55                  60

Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp
65                  70                  75                  80

Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala
85                  90                  95
```

```
His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu
            100                 105                 110

Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr
115                 120                 125

His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr
    130                 135                 140

Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser
145                 150                 155                 160

Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu
165                 170                 175

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

Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His
195                 200                 205

Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu
210                 215                 220

Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val
225                 230                 235                 240
```

<210> 49
<211> 251
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

```
Met Ala Glu Asp Leu Gly Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu
1               5                   10                  15

Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser
20                  25                  30

Ala Arg Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala
        35                  40                  45

Gly Leu Thr Thr Tyr Leu Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu
    50                  55                  60

Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser
65                  70                  75                  80

His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg
85                  90                  95
```

```
Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn
            100                 105                 110

Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr
        115                 120                 125

Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser
    130                 135                 140

Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser
145                 150                 155                 160

Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser
                165                 170                 175

Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr
            180                 185                 190

Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp
        195                 200                 205

Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp
210                 215                 220

Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys
225                 230                 235                 240

Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu
                245                 250
```

<210> 50
<211> 199
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

```
Met Thr Leu His Pro Ser Pro Ile Thr Cys Glu Phe Leu Phe Ser Thr
1               5                   10                  15

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

Leu Ser His Ser Arg Thr Gln Gly Ala Gln Arg Ser Ser Trp Lys Leu
35                  40                  45

Trp Leu Phe Cys Ser Ile Val Met Leu Leu Phe Leu Cys Ser Phe Ser
    50                  55                  60

Trp Leu Ile Phe Ile Phe Leu Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys
65                  70                  75                  80
```

Met Ala Lys Phe Gly Pro Leu Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser
85 90 95

Glu Pro Pro Cys Val Asn Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu
100 105 110

Gln Asn Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn
115 120 125

Tyr Asn Asp Val Ala Pro Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp
130 135 140

Met Ile Gln Thr Leu Thr Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly
145 150 155 160

Thr Tyr Glu Leu His Val Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser
165 170 175

Glu His Gln Val Leu Lys Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu
180 185 190

Ala Asn Pro Gln Phe Ile Ser
195

<210> 51
<211> 391
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Met Gly Tyr Pro Glu Val Glu Arg Arg Glu Leu Leu Pro Ala Ala Ala
1 5 10 15

Pro Arg Glu Arg Gly Ser Gln Gly Cys Gly Cys Gly Gly Ala Pro Ala
20 25 30

Arg Ala Gly Glu Gly Asn Ser Cys Leu Leu Phe Leu Gly Phe Phe Gly
35 40 45

Leu Ser Leu Ala Leu His Leu Leu Thr Leu Cys Cys Tyr Leu Glu Leu
50 55 60

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

Ser Gly Thr Pro Gly Thr Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Gly Gly Leu
85 90 95

Asp Pro Asp Ser Pro Ile Thr Ser His Leu Gly Gln Pro Ser Pro Lys
100 105 110

```
Gln Gln Pro Leu Glu Pro Gly Glu Ala Ala Leu His Ser Asp Ser Gln
115                 120                 125

Asp Gly His Gln Met Ala Leu Leu Asn Phe Phe Phe Pro Asp Glu Lys
130                 135                 140

Pro Tyr Ser Glu Glu Glu Ser Arg Arg Val Arg Arg Asn Lys Arg Ser
145                 150                 155                 160

Lys Ser Asn Glu Gly Ala Asp Gly Pro Val Lys Asn Lys Lys Lys Gly
                165                 170                 175

Lys Lys Ala Gly Pro Pro Gly Pro Asn Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
            180                 185                 190

Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ile
        195                 200                 205

Pro Gly Thr Thr Val Met Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
    210                 215                 220

Pro Gln Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ala Asp Lys
225                 230                 235                 240

Ala Gly Thr Arg Glu Asn Gln Pro Ala Val Val His Leu Gln Gly Gln
245                 250                 255

Gly Ser Ala Ile Gln Val Lys Asn Asp Leu Ser Gly Gly Val Leu Asn
260                 265                 270

Asp Trp Ser Arg Ile Thr Met Asn Pro Lys Val Phe Lys Leu His Pro
        275                 280                 285

Arg Ser Gly Glu Leu Glu Val Leu Val Asp Gly Thr Tyr Phe Ile Tyr
    290                 295                 300

Ser Gln Val Glu Val Tyr Tyr Ile Asn Phe Thr Asp Phe Ala Ser Tyr
305                 310                 315                 320

Glu Val Val Val Asp Glu Lys Pro Phe Leu Gln Cys Thr Arg Ser Ile
                325                 330                 335

Glu Thr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Thr Cys Tyr Thr Ala Gly Val Cys
340                 345                 350

Leu Leu Lys Ala Arg Gln Lys Ile Ala Val Lys Met Val His Ala Asp
355                 360                 365

Ile Ser Ile Asn Met Ser Lys His Thr Thr Phe Phe Gly Ala Ile Arg
370                 375                 380
```

Leu Gly Glu Ala Pro Ala Ser
385 390

<210> 52
<211> 205
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

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

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> 53
<211> 133
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1 5 10 15

Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
20 25 30

Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
35 40 45

Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn
50 55 60

Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
65 70 75 80

Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
85 90 95

Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
100 105 110

Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
115 120 125

Glu Phe Cys Val Leu
130

<210> 54
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr
1 5 10 15

Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp
20 25 30

Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly
35 40 45

Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile
50 55 60

Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys
65 70 75 80

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

Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe
100 105 110

His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu
115 120 125

Phe Cys Val Leu
130

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

<220>
<223> Conector peptídico (SG4)2

<400> 55

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 56
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector peptídico

<400> 56

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector peptídico

<400> 57

Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 58
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector peptídico

<400> 58

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 59
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector peptídico

<400> 59

Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser
1 5

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector peptídico

<400> 60

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 61
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector peptídico

<400> 61

Gly Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 62
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector peptídico

<400> 62

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 63
<211> 8

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector peptídico

<400> 63

Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly
1 5

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector peptídico

<400> 64

Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 65
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector peptídico

<400> 65

Gly Gly Asn Gly Ser Gly
1 5

<210> 66
<211> 2154
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-254) -CH1 cadena de botón de Fc

<400> 66
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 600

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 660

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 720

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 780

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 840

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 900

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 960

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 1020

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 1080

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaaggggggc 1140

ggaggaagcg gaggggggagg aagtgctagc accaagggcc ctagcgtgtt ccctctggcc 1200

cctagcagca agagcacaag tggaggaaca gccgccctgg gctgcctggt caaggactac 1260

ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaat tctggcgccc tgacaagcgg cgtgcacaca 1320

tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg tactctctga gcagcgtcgt gaccgtgccc 1380

tctagctctc tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc 1440

aaagtggaca agaaggtgga acccaagagc tgcgacaaga cccacacctg tccccttgc 1500

cctgcccctg aagctgctgg tggcccttcc gtgttcctgt tccccccaaa gcccaaggac 1560

accctgatga tcagccggac ccccgaagtg acctgcgtgg tggtcgatgt gtcccacgag 1620

gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg gacggcgtgg aagtgcacaa tgccaagacc 1680

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1740

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc 1800

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1860

accctgcccc catgccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc 1920

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1980

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 2040

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 2100

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 2154

<210> 67
<211> 903
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu humonomérico (71-254) -CL

<400> 67
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctcgtacggt ggctgcacca 600

tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg 660

tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc 720

ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 780

agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 840

tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag 900

tgt 903

<210> 68
<211> 1338
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada ojal de Fc FAP(28H1)

<400> 68
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180

gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300

ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag 360

ggcccctccg tgttccccct ggcccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgct 420

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcgga 480

gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagttctgg cctgtatagc 540

ctgagcagcg tggtcaccgt gccttctagc agcctgggca cccagaccta catctgcaac 600

gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaagg tggagcccaa gagctgcgac 660

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc 720

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 780

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960

aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020

cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1080

caggtcagcc tctcgtgcgc agtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200

ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320

tccctgtctc cgggtaaa 1338

<210> 69
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera FAP(28H1)

<400> 69
gagatcgtgc tgacccagtc ccccggcacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgtcctgca gagcctccca gtccgtgtcc cggtcctacc tcgcctggta tcagcagaag 120

cccggccagg cccctcggct gctgatcatc ggcgcctcta ccagagccac cggcatccct 180

gaccggttct ccggctctgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccggctggaa 240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggccagg tcatccctcc cacctttggc 300

cagggcacca aggtggaaat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 70
<211> 309
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 70

Met Asp Gln His Thr Leu Asp Val Glu Asp Thr Ala Asp Ala Arg His
1 5 10 15

Pro Ala Gly Thr Ser Cys Pro Ser Asp Ala Ala Leu Leu Arg Asp Thr
20 25 30

Gly Leu Leu Ala Asp Ala Ala Leu Leu Ser Asp Thr Val Arg Pro Thr

```
35                  40                  45

Asn Ala Ala Leu Pro Thr Asp Ala Ala Tyr Pro Ala Val Asn Val Arg
    50                  55                  60

Asp Arg Glu Ala Ala Trp Pro Pro Ala Leu Asn Phe Cys Ser Arg His
65                  70                  75                  80

Pro Lys Leu Tyr Gly Leu Val Ala Leu Val Leu Leu Leu Leu Ile Ala
                85                  90                  95

Ala Cys Val Pro Ile Phe Thr Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu Thr
            100                 105                 110

Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp Gln
115                 120                 125

Val Thr Pro Val Ser His Ile Gly Cys Pro Asn Thr Thr Gln Gln Gly
130                 135                 140

Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu Cys
145                 150                 155                 160

Asn Thr Thr Leu Asn Trp His Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser Tyr
                165                 170                 175

Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val Val
            180                 185                 190

Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser Pro
        195                 200                 205

Thr Phe Thr Asn Thr Gly His Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu Val
    210                 215                 220

Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val Asp Asp Phe Asp Asn Leu Ala Leu Thr
225                 230                 235                 240

Val Glu Leu Phe Pro Cys Ser Met Glu Asn Lys Leu Val Asp Arg Ser
                245                 250                 255

Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val Gly
            260                 265                 270

Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp Glu
275                 280                 285

Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys Pro
290                 295                 300
```

Asp Asn Pro Trp Glu
305

<210> 71
<211> 2298
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL dimérico (71-254) -CH1-cadena de botón de Fc

<400> 71
agaaccgagc ccagacccgc cctgaccatc accaccagcc ctaacctggg caccagagag 60

aacaacgccg accaagtgac ccccgtgtcc cacatcggca gccccaatac cacacagcag 120

ggcagccctg tgttcgccaa gctgctggcc aagaaccagg ccagcctgag caacaccacc 180

ctgaactggc acagccagga tggcgccgga agcagctatc tgagccaggg cctgagatac 240

gaagaggaca agaaagaact ggtggtggac agccctggcc tgtactacgt gttcctggaa 300

ctgaagctga gccccacctt caccaacacc ggccacaagg tgcagggctg ggtgtcactg 360

gtgctgcagg ccaaacccca ggtggacgac ttcgacaacc tggccctgac cgtggaactg 420

ttccccagca gcatggaaaa caagctggtg gatcggagct ggtcccagct tctgctgctg 480

aaggccggac acagactgag cgtgggcctg agggcttatc tgcacggcgc ccaggacgcc 540

tacagagact gggagctgag ctaccccaac acaaccagct tcggcctgtt cctcgtgaag 600

cccgacaacc cttgggaagg cggcggagga tctggcggag gcggatctag aacagagcct 660

cggcctgccc tgacaattac cacatccccc aatctgggca cccgggaaaa caatgcagat 720

caagtgacac ctgtgtctca tattggctcc ccaaacacta cccagcaggg ctcccccgtg 780

tttgctaaac tgctggctaa aaatcaggcc tccctgtcta acacaacact gaactggcac 840

tcccaggacg gcgctggcag ctcttacctg agtcagggac tgcgctatga ggaagataag 900

aaagaactgg tggtggattc ccccggactg tactatgtgt ttctggaact gaaactgtcc 960

cctaccttta caaataccgg gcacaaagtg cagggatggg tgtccctggt gctgcaggct 1020

aagcctcagg tggacgattt tgataatctg gctctgacag tggaactgtt tcctagcagc 1080

atggaaaaca agctggtgga cagaagctgg tcccagctcc tgctgctgaa ggccggacac 1140

agactgagcg tgggcctgag agcctatctg cacggcgccc aggacgccta cagagactgg 1200

gagctgagct accccaacac aaccagcttc ggcctgttcc tcgtgaagcc cgacaaccct 1260

tgggaaggcg gcggaggatc tggcggaggc ggatccagag ctgatgctgc ccctaccgtg 1320

tccatcttcc cacccagcag cgagcagctg acatctgggg gagctagcgt cgtgtgcttc 1380

ctgaacaact tctaccccaa ggacatcaac gtgaagtgga agatcgacgg cagcgagcgg 1440

cagaacggcg tgctgaatag ctggaccgac caggacagca aggactccac ctacagcatg 1500

agcagcaccc tgaccctgac caaggacgag tacgagcggc acaacagcta cacatgcgag 1560

gccacccaca agaccagcac cagccccatc gtgaagtcct tcaaccggaa cgagtgcgtg 1620

cccagagact gcggctgcaa gccttgcatc tgcaccgtgc ctgaggtgtc cagcgtgttc 1680

atcttcccac ccaagcccaa ggacgtgctg accatcaccc tgacacccaa agtgacctgc 1740

gtggtggtgg ccatcagcaa ggatgacccc gaggtgcagt tcagttggtt cgtggacgac 1800

gtggaagtgc acaccgctca gaccaagccc agagaggaac agatcaacag caccttcaga 1860

agcgtgtccg agctgcccat catgcaccag gactggctga acggcaaaga attcaagtgc 1920

agagtgaaca gcgccgcctt tggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa gaccaagggc 1980

agacccaagg ccccccaggt gtacacaatc cccccaccca aagaacagat ggccaaggac 2040

aaggtgtccc tgacctgcat gatcaccaat ttcttcccag aggatatcac cgtggaatgg 2100

cagtggaacg gccagcccgc cgagaactac gacaacaccc agcctatcat ggacaccgac 2160

ggctcctact tcgtgtacag cgacctgaac gtgcagaagt ccaactggga ggccggcaac 2220

accttcacct gtagcgtgct gcacgagggc ctgcacaacc accacaccga gaagtccctg 2280

tcccacagcc ctggcaag 2298

<210> 72
<211> 954
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL mu monomérico (71-254) -CL, fusión

<400> 72
agaaccgagc ccagacccgc cctgaccatc accaccagcc ctaacctggg caccagagag 60

aacaacgccg accaagtgac ccccgtgtcc cacatcggca gccccaatac cacacagcag 120

ggcagccctg tgttcgccaa gctgctggcc aagaaccagg ccagcctgag caacaccacc 180

ctgaactggc acagccagga tggcgccgga agcagctatc tgagccaggg cctgagatac 240

gaagaggaca agaaagaact ggtggtggac agccctggcc tgtactacgt gttcctggaa 300

ctgaagctga gccccacctt caccaacacc ggccacaagg tgcagggctg ggtgtcactg 360

gtgctgcagg ccaaacccca ggtggacgac ttcgacaacc tggccctgac cgtggaactg 420

ttccccagca gcatggaaaa caagctggtg gatcggagct ggtcccagct tctgctgctg 480

aaggccggac acagactgag cgtgggcctg agggcctatc tgcatggcgc ccaggacgcc 540

tacagagact gggagctgag ctaccccaac acaaccagct tcggcctgtt cctcgtgaag 600

cccgacaacc cttgggaagg cggcggaggc tccggaggag gcggaagcgc taagaccacc 660

ccccccagcg tgtaccctct ggcccctgga tctgccgccc agaccaacag catggtgacc 720

ctgggctgcc tggtgaaggg ctacttcccc gagcctgtga ccgtgacctg gaacagcggc 780

agcctgagca gcggcgtgca cacctttcca gccgtgctgc agagcgacct gtacaccctg 840

agcagctccg tgaccgtgcc tagcagcacc tggcccagcc agacagtgac ctgcaacgtg 900

gcccaccctg ccagcagcac caaggtggac aagaaaatcg tgccccggga ctgc 954

<210> 73
<211> 1320
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada KK Fc FAP

<400> 73
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180

gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300

ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc taagaccacc 360

ccccctagcg tgtaccctct ggcccctgga tctgccgccc agaccaacag catggtgacc 420

ctgggctgcc tggtgaaggg ctacttcccc gagcctgtga ccgtgacctg gaacagcggc 480

agcctgagca gcggcgtgca cacctttcca gccgtgctgc agagcgacct gtacaccctg 540

agcagctccg tgaccgtgcc tagcagcacc tggcccagcc agacagtgac ctgcaacgtg 600

gcccaccctg ccagcagcac caaggtggac aagaaaatcg tgccccggga ctgcggctgc 660

aagccctgca tctgcaccgt gcccgaggtg tccagcgtgt tcatcttccc acccaagccc 720

aaggacgtgc tgaccatcac cctgaccccc aaagtgacct gcgtggtggt ggccatcagc 780

aaggacgacc ccgaggtgca gttctcttgg tttgtggacg acgtggaggt gcacacagcc 840

cagacaaagc cccgggagga acagatcaac agcaccttca gaagcgtgtc cgagctgccc 900

atcatgcacc aggactggct gaacggcaaa gaattcaagt gcagagtgaa cagcgccgcc 960

ttcggcgccc ccatcgagaa aaccatcagc aagaccaagg gcagacccaa ggcccccccag 1020

gtgtacacca tccccccacc caaaaaacag atggccaagg acaaggtgtc cctgacctgc 1080

atgatcacca acttttttccc cgaggacatc accgtggagt ggcagtggaa tggccagccc 1140

gccgagaact acaagaacac ccagcccatc atgaagaccg acggcagcta cttcgtgtac 1200

agcaagctga acgtgcagaa gtccaactgg gaggccggca acaccttcac ctgtagcgtg 1260

ctgcacgagg gcctgcacaa ccaccacacc gagaagtccc tgagccactc ccccggcaag 1320

<210> 74
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera FAP

<400> 74
gagatcgtgc tgacccagtc ccccggcacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgtcctgca gagcctccca gtccgtgtcc cggtcctacc tcgcctggta tcagcagaag 120

cccggccagg cccctcggct gctgatcatc ggcgcctcta ccagagccac cggcatccct 180

gaccggttct ccggctctgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccggctggaa 240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggccagg tcatccctcc cacctttggc 300

cagggcacca aggtggaaat caagcgtgcc gatgctgcac caactgtatc gattttccca 360

ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc 420

taccccaaag acatcaatgt caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgtc 480

ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcaccctc 540

acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag 600

acatcaactt cacccattgt caagagcttc aacaggaatg agtgt 645

<210> 75
<211> 766
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL mu dimérico (71-254)-CH1-cadena pesada DD Fc

<400> 75

Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu Thr Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu
1 5 10 15

Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp Gln Val Thr Pro Val Ser His Ile
20 25 30

Gly Ser Pro Asn Thr Thr Gln Gln Gly Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu
35 40 45

Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu Ser Asn Thr Thr Leu Asn Trp His
50 55 60

Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser Tyr Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr
65 70 75 80

Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val Val Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr
85 90 95

Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly His
100 105 110

Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu Val Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val
115 120 125

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

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

```
Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val Gly Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly
                165                 170                 175

Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp Glu Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr
            180                 185                 190

Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys Pro Asp Asn Pro Trp Glu Gly Gly
        195                 200                 205

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu
    210                 215                 220

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

Gln Val Thr Pro Val Ser His Ile Gly Ser Pro Asn Thr Thr Gln Gln
245                 250                 255

Gly Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu
            260                 265                 270

Ser Asn Thr Thr Leu Asn Trp His Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser
        275                 280                 285

Tyr Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val
290                 295                 300

Val Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser
305                 310                 315                 320

Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly His Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu
                325                 330                 335

Val Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val Asp Asp Phe Asp Asn Leu Ala Leu
            340                 345                 350

Thr Val Glu Leu Phe Pro Ser Ser Met Glu Asn Lys Leu Val Asp Arg
        355                 360                 365

Ser Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val
    370                 375                 380

Gly Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp
385                 390                 395                 400

Glu Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys
                405                 410                 415

Pro Asp Asn Pro Trp Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
```

420 425 430

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
435 440 445

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
450 455 460

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
465 470 475 480

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
485 490 495

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
500 505 510

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
515 520 525

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Val Pro Arg Asp Cys
530 535 540

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
545 550 555 560

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
565 570 575

Lys Val Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
580 585 590

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
595 600 605

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
610 615 620

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
625 630 635 640

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
645 650 655

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
660 665 670

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
675 680 685

```
Thr Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
    690                 695                 700

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Asp Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
705                 710                 715                 720

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
725                 730                 735

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
            740                 745                 750

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
755                 760                 765
```

<210> 76
<211> 318
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL mu monomérico (71-254) -CL, fusión

<400> 76

```
Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu Thr Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu
1               5                   10                  15

Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp Gln Val Thr Pro Val Ser His Ile
20                  25                  30

Gly Ser Pro Asn Thr Thr Gln Gln Gly Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu
         35                  40                  45

Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu Ser Asn Thr Thr Leu Asn Trp His
50                  55                  60

Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser Tyr Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr
65                  70                  75                  80

Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val Val Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr
                85                  90                  95

Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly His
100                 105                 110

Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu Val Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val
         115                 120                 125

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

Met Glu Asn Lys Leu Val Asp Arg Ser Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu
```

145 150 155 160

Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val Gly Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly
165 170 175

Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp Glu Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr
180 185 190

Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys Pro Asp Asn Pro Trp Glu Gly Gly
195 200 205

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
210 215 220

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
225 230 235 240

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
245 250 255

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
260 265 270

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
275 280 285

Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
290 295 300

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
305 310 315

<210> 77
<211> 440
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada KK Fc anti-FAP

<400> 77

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala
        115                 120                 125

Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140

Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp
                165                 170                 175

Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro
180                 185                 190

Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
        195                 200                 205

Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile
    210                 215                 220

Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro
225                 230                 235                 240

Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val
                245                 250                 255

Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val
            260                 265                 270

Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
        275                 280                 285

Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln
    290                 295                 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala
305                 310                 315                 320

Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro
```

325 330 335

Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Lys Gln Met Ala
340 345 350

Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro Glu
355 360 365

Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr
370 375 380

Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr
385 390 395 400

Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe
405 410 415

Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys
420 425 430

Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 78
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera anti-FAP

<400> 78

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 Arg Ser
20 25 30

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

Ile Ile Gly Ala Ser Thr 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 Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala
100 105 110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
115 120 125

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

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 79
<211> 1335
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada ojal Fc DP47

<400> 79
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360

ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480

ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgtg caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tcgtgagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320

ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 80
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera DP47

<400> 80
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc 300

caggggacca aagtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 81
<211> 445
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada ojal Fc DP47

<400> 81

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 Ser Gly Ser Gly 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

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

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

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

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> 82
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera DP47

<400> 82

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

```
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>  83
<211>  163
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  83

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

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> 84
<211> 163
<212> PRT
<213> Cynomolgus

<400> 84

Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Ser 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 Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly Ala Glu 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

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 85
<211> 164
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 85

Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys
1 5 10 15

Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile
20 25 30

Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe
35 40 45

Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr His Asn Ala Glu Cys Glu Cys
50 55 60

Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys
65 70 75 80

Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys
85 90 95

Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr
115 120 125

Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro Pro Val Val Ser Phe Ser Pro
130 135 140

Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu Gly Gly Pro Gly Gly His Ser
145 150 155 160

Leu Gln Val Leu

<210> 86
<211> 681
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc

<400> 86
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 87
<211> 1266
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BB hu botón de Fc fusión

<400> 87
ctgcaggacc cctgcagcaa ctgccctgcc ggcaccttct gcgacaacaa ccggaaccag 60

atctgcagcc cctgcccccc caacagcttc agctctgccg gcggacagcg gacctgcgac 120

atctgcagac agtgcaaggg cgtgttcaga acccggaaag agtgcagcag caccagcaac 180

gccgagtgcg actgcacccc cggcttccat tgtctgggag ccggctgcag catgtgcgag 240

caggactgca agcagggcca ggaactgacc aagaagggct gcaaggactg ctgcttcggc 300

accttcaacg accagaagcg gggcatctgc cggccctgga ccaactgtag cctggacggc 360

aagagcgtgc tggtcaacgg caccaaagaa cgggacgtcg tgtgcggccc cagccctgct 420

gatctgtctc ctggggccag cagcgtgacc cctcctgccc ctgccagaga gcctggccac 480

tctcctcagg tcgacgaaca gttatatttt cagggcggct cacccaaatc tgcagacaaa 540

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 600

ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 660

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 720

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 780

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 840

gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 900

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 960

gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1020

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1080

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1140

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1200

ctgtctccgg gtaaatccgg aggcctgaac gacatcttcg aggcccagaa gattgaatgg 1260

cacgag 1266

<210> 88
<211> 1266
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BB cy botón de Fc fusión

<400> 88
ttgcaggatc tgtgtagtaa ctgcccagct ggtacattct gtgataataa caggagtcag 60

atttgcagtc cctgtcctcc aaatagtttc tccagcgcag gtggacaaag gacctgtgac 120

atatgcaggc agtgtaaagg tgttttcaag accaggaagg agtgttcctc caccagcaat 180

gcagagtgtg actgcatttc agggtatcac tgcctggggg cagagtgcag catgtgtgaa 240

caggattgta aacaaggtca agaattgaca aaaaaaggtt gtaaagactg ttgctttggg 300

acatttaatg accagaaacg tggcatctgt cgcccctgga caaactgttc tttggatgga 360

aagtctgtgc ttgtgaatgg gacgaaggag agggacgtgg tctgcggacc atctccagcc 420

gacctctctc caggagcatc ctctgcgacc ccgcctgccc ctgcgagaga gccaggacac 480

tctccgcagg tcgacgaaca gttatatttt cagggcggct cacccaaatc tgcagacaaa 540

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 600

ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 660

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 720

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 780

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 840

gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 900

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 960

gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1020

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1080

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1140

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1200

ctgtctccgg gtaaatccgg aggcctgaac gacatcttcg aggcccagaa gattgaatgg 1260

cacgag 1266

<210> 89
<211> 1269

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BB mu botón de Fc fusión

<400> 89
gtgcagaaca gctgcgacaa ctgccagccc ggcaccttct gccggaagta caaccccgtg 60

tgcaagagct gccccccccag caccttcagc agcatcggcg gccagcccaa ctgcaacatc 120

tgcagagtgt gcgccggcta cttccggttc aagaagttct gcagcagcac ccacaacgcc 180

gagtgcgagt gcatcgaggg cttccactgc ctgggccccc agtgcaccag atgcgagaag 240

gactgcagac ccggccagga actgaccaag cagggctgta agacctgcag cctgggcacc 300

ttcaacgacc agaacgggac cggcgtgtgc cggccttgga ccaattgcag cctggacggg 360

agaagcgtgc tgaaaaccgg caccaccgag aaggacgtcg tgtgcggccc tcccgtggtg 420

tccttcagcc ctagcaccac catcagcgtg acccctgaag gcggccctgg cggacactct 480

ctgcaggtcc tggtcgacga acagttatat tttcagggcg gctcacccaa atctgcagac 540

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 600

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 660

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 720

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 780

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 840

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 900

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 960

caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1020

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1080

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1140

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1200

tccctgtctc cgggtaaatc cggaggcctg aacgacatct tcgaggccca gaagattgaa 1260

tggcacgag 1269

<210> 90
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc

<400> 90

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

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

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

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

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

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

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

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 91
<211> 422
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BB hu botón de Fc fusión

<400> 91

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

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

Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
            180                 185                 190

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
        195                 200                 205

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
    210                 215                 220

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
225                 230                 235                 240

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
                245                 250                 255

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
            260                 265                 270

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
```

275 280 285

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
290 295 300

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
305 310 315 320

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
325 330 335

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

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
355 360 365

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
370 375 380

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
385 390 395 400

Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
405 410 415

Lys Ile Glu Trp His Glu
420

<210> 92
<211> 422
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BB cy botón de Fc fusión

<400> 92

Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Ser 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 Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly Ala Glu 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

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
    130                 135                 140

Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145                 150                 155                 160

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

Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
            180                 185                 190

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
        195                 200                 205

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
    210                 215                 220

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
225                 230                 235                 240

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
                245                 250                 255

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
            260                 265                 270

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
        275                 280                 285

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
    290                 295                 300

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
305                 310                 315                 320

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
                325                 330                 335

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
```

340 345 350

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
355 360 365

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
370 375 380

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
385 390 395 400

Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
405 410 415

Lys Ile Glu Trp His Glu
420

<210> 93
<211> 423
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BB mu botón de Fc fusión

<400> 93

Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys
1 5 10 15

Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile
20 25 30

Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe
35 40 45

Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr His Asn Ala Glu Cys Glu Cys
50 55 60

Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys
65 70 75 80

Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys
85 90 95

Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr
115 120 125

Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro Pro Val Val Ser Phe Ser Pro
130 135 140

```
Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu Gly Gly Pro Gly Gly His Ser
145                 150                 155                 160

Leu Gln Val Leu Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro
                165                 170                 175

Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
            180                 185                 190

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        195                 200                 205

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    210                 215                 220

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
225                 230                 235                 240

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                245                 250                 255

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            260                 265                 270

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        275                 280                 285

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
305                 310                 315                 320

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                325                 330                 335

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            340                 345                 350

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        355                 360                 365

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
    370                 375                 380

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
385                 390                 395                 400

Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala
```

405 410 415

Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
420

<210> 94
<211> 594
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BB hu con marca His

<400> 94
ctgcaggacc cctgcagcaa ctgccctgcc ggcaccttct gcgacaacaa ccggaaccag 60

atctgcagcc cctgcccccc caacagcttc agctctgccg gcggacagcg gacctgcgac 120

atctgcagac agtgcaaggg cgtgttcaga acccggaaag agtgcagcag caccagcaac 180

gccgagtgcg actgcacccc cggcttccat tgtctgggag ccggctgcag catgtgcgag 240

caggactgca agcagggcca ggaactgacc aagaagggct gcaaggactg ctgcttcggc 300

accttcaacg accagaagcg gggcatctgc cggccctgga ccaactgtag cctggacggc 360

aagagcgtgc tggtcaacgg caccaaagaa cgggacgtcg tgtgcggccc cagccctgct 420

gatctgtctc ctggggccag cagcgtgacc cctcctgccc ctgccagaga gcctggccac 480

tctcctcagg tcgacgaaca gttatatttt cagggcggct caggcctgaa cgacatcttc 540

gaggcccaga agatcgagtg gcacgaggct cgagctcacc accatcacca tcac 594

<210> 95
<211> 198
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BB hu con marca His

<400> 95

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

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 Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Gly Leu
                165                 170                 175

Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ala Arg Ala
            180                 185                 190

His His His His His His
        195
```

<210> 96
<211> 178
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96

```
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

<210> 97
<211> 366
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico conectado por (G4S)2

<400> 97

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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
355 360 365

<210> 98
<211> 360
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 98

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 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

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 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> 99
<211> 416
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (52-254) conectado por conector (G4S)2

<400> 99

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 Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser
        195                 200                 205

Gly 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

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> 100
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H1 FAP(4B9)

<400> 100

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 101
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H2 FAP(4B9)

<400> 101

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 102
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H3 FAP(4B9)

<400> 102

Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr
1 5

<210> 103
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L1 FAP(4B9)

<400> 103

Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L2 FAP(4B9)

<400> 104

Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L3 FAP(4B9)

<400> 105

Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 106
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH FAP(4B9)

<400> 106

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
115

<210> 107

<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL FAP(4B9)

<400> 107

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 Thr 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 Asn Val Gly Ser Arg 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 Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 108
<211> 718
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CH1* cadena de botón de Fc

<400> 108

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 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 Gly Ser Gly
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
385                 390                 395                 400

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
                405                 410                 415

Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
420                 425                 430

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
435                 440                 445

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
450                 455                 460

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
465                 470                 475                 480

Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
                485                 490                 495

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
            500                 505                 510

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

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

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

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

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
580                 585                 590

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

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
    610                 615                 620
```

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

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

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

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
690 695 700

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715

<210> 109
<211> 301
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 109

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 Gly Ser Gly Gly Gly
180                 185                 190

Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
        195                 200                 205

Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
    210                 215                 220

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
225                 230                 235                 240

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
                245                 250                 255

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
260                 265                 270

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
275                 280                 285

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    290                 295                 300
```

<210> 110
<211> 296
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (71-254) -(G4S)1- CL*

<400> 110

```
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 Gly Ser Arg Thr Val
            180                 185                 190

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
        195                 200                 205

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
210                 215                 220

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
225                 230                 235                 240

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
245                 250                 255

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
260                 265                 270

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
290                 295

<210>  111
<211>  756
<212>  PRT
```

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (52-254) - CH1* cadena de botón de Fc

<400> 111

```
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 Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser
        195                 200                 205

Gly 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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
420                 425                 430

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
        435                 440                 445

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
450                 455                 460

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
465                 470                 475                 480

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
485                 490                 495

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
            500                 505                 510
```

```
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser
515                 520                 525

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
    530                 535                 540

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
545                 550                 555                 560

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
                565                 570                 575

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
            580                 585                 590

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
        595                 600                 605

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
    610                 615                 620

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
625                 630                 635                 640

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
                645                 650                 655

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
            660                 665                 670

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
        675                 680                 685

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
    690                 695                 700

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
705                 710                 715                 720

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
                725                 730                 735

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
740                 745                 750

Ser Pro Gly Lys
        755
```

<210> 112
<211> 320

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (52-254) -CL*

<400> 112

```
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 Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser
        195                 200                 205

Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
    210                 215                 220

Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
225                 230                 235                 240
```

```
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
245                 250                 255

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
            260                 265                 270

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
275                 280                 285

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
290                 295                 300

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
305                 310                 315                 320
```

<210> 113
<211> 700
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (80-254) - CH1* cadena de botón de Fc

<400> 113

```
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 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

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 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
355                 360                 365

Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
    370                 375                 380

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu
385                 390                 395                 400

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
                405                 410                 415
```

```
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
420                 425                 430

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
435                 440                 445

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
    450                 455                 460

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
465                 470                 475                 480

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
                485                 490                 495

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
            500                 505                 510

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
        515                 520                 525

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
    530                 535                 540

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
545                 550                 555                 560

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
565                 570                 575

Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
            580                 585                 590

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
        595                 600                 605

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
    610                 615                 620

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
625                 630                 635                 640

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
                645                 650                 655

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
660                 665                 670

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
675                 680                 685
```

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695 700

<210> 114
<211> 292
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (80-254) -CL*

<400> 114

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 Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
180 185 190

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala
195 200 205

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
210 215 220

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
225 230 235 240

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

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
260 265 270

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
275 280 285

Arg Gly Glu Cys
290

<210> 115
<211> 722
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón de Fc

<400> 115

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 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 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> 116
<211> 297
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 116

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 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

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> 117
<211> 722
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL cadena de botón de Fc

<400> 117

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 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 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 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> 118
<211> 297
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 118

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 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> 119
<211> 710
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL* cadena de botón de Fc

<400> 119

```
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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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 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

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> 120
<211> 291
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1*

<400> 120

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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

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> 121
<211> 833
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc anti-FAP (28H1) fusionada a 4-1BBL hu dimérico (71-254)

<400> 121

```
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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50                  55                  60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130                 135                 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270
```

```
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

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

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

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

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
340                 345                 350

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

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420                 425                 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp
    450                 455                 460

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
465                 470                 475                 480

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
485                 490                 495

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
            500                 505                 510

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
        515                 520                 525

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
530                 535                 540
```

```
Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
545                 550                 555                 560

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
                565                 570                 575

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
580                 585                 590

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
595                 600                 605

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
    610                 615                 620

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly
625                 630                 635                 640

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser
                645                 650                 655

Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala
660                 665                 670

Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp
675                 680                 685

Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser
    690                 695                 700

Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr
705                 710                 715                 720

Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly
725                 730                 735

Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala
740                 745                 750

Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser
755                 760                 765

Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His
770                 775                 780

Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg
785                 790                 795                 800

Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu
```

805 810 815

Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser
820 825 830

Glu

<210> 122
<211> 639
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de botón de Fc anti-FAP (28H1) fusionada a 4-1BBL hu monomérico (71-254)

<400> 122

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

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

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

```
180                 185                 190

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

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

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

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

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

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

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

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

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

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                 410                 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420                 425                 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
        435                 440                 445
```

```
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp
    450                 455                 460

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
465                 470                 475                 480

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
485                 490                 495

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
            500                 505                 510

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
        515                 520                 525

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
530                 535                 540

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
545                 550                 555                 560

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
                565                 570                 575

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
580                 585                 590

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
595                 600                 605

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
610                 615                 620

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
625                 630                 635
```

<210> 123
<211> 834
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc anti-FAP (4B9) fusionada a 4-1BBL hu dimérico (71-254)

<400> 123

```
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

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 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 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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 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

Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg
820                 825                 830

Ser Glu
```

<210> 124
<211> 640
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de botón de Fc anti-FAP (4B9) fusionada a 4-1BBL hu monomérico (71-254)

<400> 124

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

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

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 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> 125
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera anti-FAP (4B9)

<400> 125

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 Thr 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 Asn Val Gly Ser Arg 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 Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro 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> 126
<211> 822
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc anti-FAP (4B9) fusionada a 4-1BBL hu dimérico (71-248)

<400> 126

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

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 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 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly
625 630 635 640

Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala
645 650 655

Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln
660 665 670

Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly
675 680 685

Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr
690 695 700

Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln
705 710 715 720

Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser
725 730 735

Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala
740 745 750

Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn
755 760 765

Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln
770 775 780

Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp
785 790 795 800

Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro
805 810 815

Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820

<210> 127
<211> 634
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de botón de Fc anti-FAP (4B9) fusionada a 4-1BBL hu monomérico (71-248)

<400> 127

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

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

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 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
625 630

<210> 128
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector peptídico G4S

<400> 128

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 129
<211> 2166
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL* cadena de botón de Fc

<400> 129
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 600

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 660

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 720

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 780

aaagctgggg tgtactatgt gttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 840

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 900

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 960

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 1020

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 1080

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaagggggc 1140

ggaggttccg gagggggagg atctcgtacg gtggctgcac catctgtctt tatcttccca 1200

cccagcgacc ggaagctgaa gtctggcaca gccagcgtcg tgtgcctgct gaataacttc 1260

taccccgcg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaatg ccctgcagag cggcaacagc 1320

caggaaagcg tgaccgagca ggacagcaag gactccacct acagcctgag cagcaccctg 1380

accctgagca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gacccaccag 1440

ggcctgtcta gccccgtgac caagagcttc aaccggggcg agtgcgacaa gacccacacc 1500

tgtcctccat gccctgcccc tgaagctgct ggcggcccta gcgtgttcct gttcccccca 1560

aagcccaagg acaccctgat gatcagccgg acccctgaag tgacctgcgt ggtggtggat 1620

gtgtcccacg aggaccctga agtgaagttc aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac 1680

aatgccaaga ccaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1740

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1800

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1860

ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1920

tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1980

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 2040

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 2100

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 2160

ggtaaa 2166

<210> 130
<211> 891
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 130
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggct ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggccggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

agactgggag tgcatctgca cacagaggcc agagccaggc acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg cctgcctagc 540

cctagatctg aaggcggcgg aggttccgga ggcggaggat ctgctagcac aaagggcccc 600

agcgtgttcc ctctggcccc tagcagcaag agcacatctg gcggaacagc cgccctgggc 660

tgcctggtgg aagattactt ccccgagccc gtgaccgtgt cctggaattc tggcgccctg 720

acaagcggcg tgcacacctt ccagccgtg ctgcagagca gcggcctgta ctctctgagc 780

agcgtcgtga cagtgcccag cagctctctg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac 840

cacaagccca gcaacaccaa ggtggacgag aaggtggaac ccaagtcctg c 891

<210> 131
<211> 2154
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CH1* cadena de botón de Fc

<400> 131
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 600

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 660

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 720

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 780

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 840

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 900

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 960

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 1020

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 1080

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaagggggc 1140

ggaggaagcg gaggggggagg aagtgctagc accaagggcc cctccgtgtt ccccctggcc 1200

cccagcagca agagcaccag cggcggcaca gccgctctgg gctgcctggt cgaggactac 1260

ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc 1320

ttccccgccg tgctgcagag ttctggcctg tatagcctga gcagcgtggt caccgtgcct 1380

tctagcagcc tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc 1440

aaggtggacg agaaggtgga gcccaagagc tgcgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 1500

ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac 1560

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa 1620

gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1680

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1740

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc 1800

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1860

accctgcccc catgccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc 1920

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1980

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 2040

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 2100

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 2154

<210> 132
<211> 903
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 132
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctcgtacggt ggctgcacca 600

tctgtcttca tcttcccgcc atctgatcgg aagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg 660

tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc 720

ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 780

agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 840

tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag 900

tgt 903

<210> 133
<211> 1350
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc anti-FAP (VHCL) (28H1)

<400> 133
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180

gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300

ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcgtggcc 360

gctcccagcg tgttcatctt cccacccagc gacgagcagc tgaagtccgg cacagccagc 420

gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac 480

aacgccctgc agagcggcaa cagccaggaa tccgtgaccg agcaggacag caaggactcc 540

acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg 600

tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg tccagccccg tgaccaagag cttcaaccgg 660

ggcgagtgcg acaagaccca cacctgtccc ccttgccctg cccctgaagc tgctggtggc 720

ccttccgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 780

gaagtgacct gcgtggtggt cgatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 840

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 134
<211> 639
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera anti-FAP (VLCH1) (28H1)

<400> 134
gagatcgtgc tgacccagtc tcccggcacc ctgagcctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgagctgca gagccagcca gagcgtgagc cggagctacc tggcctggta tcagcagaag 120

cccggccagg cccccagact gctgatcatc ggcgccagca cccgggccac cggcatcccc 180

gatagattca gcggcagcgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatcag ccggctggaa 240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggccagg tgatcccccc caccttcggc 300

cagggcacca aggtggaaat caagagcagc gcttccacca aaggcccttc cgtgtttcct 360

ctggctccta gctccaagtc cacctctgga ggcaccgctg ctctcggatg cctcgtgaag 420

gattattttc ctgagcctgt gacagtgtcc tggaatagcg gagcactgac ctctggagtg 480

catactttcc ccgctgtgct gcagtcctct ggactgtaca gcctgagcag cgtggtgaca 540

gtgcccagca gcagcctggg cacccagacc tacatctgca acgtgaacca caagcccagc 600

aacaccaagg tggacaagaa ggtggaaccc aagtcttgt 639

<210> 135
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc anti-FAP (VHCL) (28H1)

<400> 135

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

```
65                  70                  75                  80

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
        115                 120                 125

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
130                 135                 140

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

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
                165                 170                 175

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

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
        195                 200                 205

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 136
<211> 213
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera anti-FAP (VLCH1) (28H1)

<400> 136

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 Arg Ser
20 25 30

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

Ile Ile Gly Ala Ser Thr 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 Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser

100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 137
<211> 1572
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 137
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggct ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggccggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

agactgggag tgcatctgca cacagaggcc agagccaggc acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg cctgcctagc 540

cctagatctg aaggcggcgg aggttccgga ggcggaggat ctgctagcac caagggcccc 600

tccgtgttcc ccctggcccc cagcagcaag agcaccagcg gcggcacagc cgctctgggc 660

tgcctggtcg aggactactt ccccgagccc gtgaccgtgt cctggaacag cggagccctg 720

acctccggcg tgcacacctt ccccgccgtg ctgcagagtt ctggcctgta tagcctgagc 780

agcgtggtca ccgtgccttc tagcagcctg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac 840

cacaagccca gcaacaccaa ggtggacgag aaggtggagc ccaagagctg cgacaaaact 900

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa gctgcagggg gaccgtcagt cttcctcttc 960

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 1020

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1080

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1140

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1200

tccaacaaag ccctcggcgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1260

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1320

agcctgtggt gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1380

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1440

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1500

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1560

tctccgggta aa 1572

<210> 138
<211> 1485
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-254) -CL*

<400> 138
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 600

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 660

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 720

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 780

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 840

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 900

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 960

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 1020

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 1080

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaaggggggc 1140

ggaggttccg gagggggagg atctcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 1200

ccatctgatc ggaagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 1260

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 1320

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 1380

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 1440

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 1485

<210> 139
<211> 718
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (71-254) - CL* cadena de botón de Fc

<400> 139

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 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 Gly Ser Gly
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
385                 390                 395                 400

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
                405                 410                 415
```

```
Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
420                 425                 430

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
435                 440                 445

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
450                 455                 460

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
465                 470                 475                 480

Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
                485                 490                 495

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
            500                 505                 510

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

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

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

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

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
580                 585                 590

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

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

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

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

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

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
690 695 700

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715

<210> 140
<211> 495
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-254) -CL*

<400> 140

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 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 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
485 490 495

<210> 141
<211> 2499
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc anti-FAP (28H1) fusionada a 4-1BBL hu dimérico (71-254)

<400> 141
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180

gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300

ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag 360

ggcccctccg tgttcccct ggcccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgct 420

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcgga 480

gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagttctgg cctgtatagc 540

ctgagcagcg tggtcaccgt gccttctagc agcctgggca cccagaccta catctgcaac 600

gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaagg tggagcccaa gagctgcgac 660

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc 720

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 780

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960

aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020

cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1080

caggtcagcc tctcgtgcgc agtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200

ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320

tccctgtctc cgggtggagg cggcggaagc ggaggaggag gatccagaga gggccctgag 1380

ctgagccccg atgatcctgc tggactgctg gacctgcggc agggcatgtt tgctcagctg 1440

gtggcccaga acgtgctgct gatcgatggc cccctgtcct ggtacagcga tcctggactg 1500

gctggcgtgt cactgacagg cggcctgagc tacaaagagg acaccaaaga actggtggtg 1560

gccaaggccg gcgtgtacta cgtgttcttt cagctggaac tgcggagagt ggtggccggc 1620

gaaggatctg gctctgtgtc tctggccctg catctgcagc ctctgagaag cgctgctggc 1680

gctgcagctc tggcactgac agtggatctg cctcctgcca gctccgaggc ccggaatagc 1740

gcatttgggt ttcaaggcag gctgctgcac ctgtctgccg gccagaggct gggagtgcat 1800

ctgcacacag aggccagggc tagacacgcc tggcagctga cacagggcgc tacagtgctg 1860

ggcctgttca gagtgacccc cgagattcca gccggcctgc cttctccaag aagcgaaggc 1920

ggaggcggat ctggcggcgg aggatctaga gagggacccg aactgtcccc tgacgatcca 1980

gccgggctgc tggatctgag acagggaatg ttcgcccagc tggtggctca gaatgtgctg 2040

ctgattgacg gacctctgag ctggtactcc gacccagggc tggcaggggt gtccctgact 2100

gggggactgt cctacaaaga agatacaaaa gaactggtgg tggctaaagc tggggtgtac 2160

tatgtgtttt ttcagctgga actgaggcgg gtggtggctg gggagggctc aggatctgtg 2220

tccctggctc tgcatctgca gccactgcgc tctgctgctg gcgcagctgc actggctctg 2280

actgtggacc tgccaccagc ctctagcgag gccagaaaca gcgccttcgg gttccaagga 2340

cgcctgctgc atctgagcgc cggacagcgc ctgggagtgc atctgcatac tgaagccaga 2400

gcccggcatg cttggcagct gactcagggg gcaactgtgc tgggactgtt tcgcgtgaca 2460

cctgagatcc ctgccggact gccaagccct agatcagaa 2499

<210> 142
<211> 1917
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de botón de Fc anti-FAP (28H1) fusionada a 4-1BBL hu monomérico (71-254)

<400> 142
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180

gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300

ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag 360

ggcccatcgg tcttcccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 480

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 600

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 660

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc 720

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 780

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960

aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccctgca gagatgagct gaccaagaac 1080

caggtgtccc tgtggtgtct ggtcaagggc ttctacccca gcgatatcgc cgtggagtgg 1140

gagagcaacg gccagcctga gaacaactac aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac 1200

ggcagcttct tcctgtactc caaactgacc gtggacaaga gccggtggca gcagggcaac 1260

gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacaccca gaagtccctg 1320

agcctgagcc ccggcggagg cggcggaagc ggaggaggag gatccagaga gggccctgag 1380

ctgagccccg atgatcctgc tggactgctg gacctgcggc agggcatgtt tgctcagctg 1440

gtggcccaga acgtgctgct gatcgatggc cccctgtcct ggtacagcga tcctggactg 1500

gctggcgtgt cactgacagg cggcctgagc tacaaagagg acaccaaaga actggtggtg 1560

gccaaggccg gcgtgtacta cgtgttcttt cagctggaac tgcggagagt ggtggccggc 1620

gaaggatctg gctctgtgtc tctggccctg catctgcagc ctctgagaag cgctgctggc 1680

gctgcagctc tggcactgac agtggatctg cctcctgcca gctccgaggc ccggaatagc 1740

gcatttgggt ttcaaggcag gctgctgcac ctgtctgccg gccagaggct gggagtgcat 1800

ctgcacacag aggccagggc tagacacgcc tggcagctga cacagggcgc tacagtgctg 1860

ggcctgttca gagtgacccc cgagattcca gccggcctgc cttctccaag aagcgaa 1917

<210> 143
<211> 888
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (71-254) -(G4S)1- CL*

<400> 143
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctcgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc 600

ccgccatctg atcggaagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 660

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 720

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 780

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 840

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 888

<210> 144
<211> 2028
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc [anti-FAP (28H1)]2

<400> 144
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180

gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300

ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcacaaag 360

ggacctagcg tgttcccccc ggcccccagc agcaagtcta catctggcgg aacagccgcc 420

ctgggctgcc tcgtgaagga ctactttccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaactctggc 480

gctctgacaa gcggcgtgca cacctttcca gccgtgctgc agagcagcgg cctgtactct 540

ctgagcagcg tcgtgacagt gcccagcagc tctctgggca cccagaccta catctgcaac 600

gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaagg tggaacccaa gagctgcgac 660

ggcggagggg gatctggcgg cggaggatcc gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc 720

ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc 780

tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc 840

atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc gactctgtga agggccggtt caccatctcc 900

cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc 960

gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg ggcaacttcg actactgggg acagggcacc 1020

ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag ggcccctccg tgttcccccc ggcccccagc 1080

agcaagagca ccagcggcgg cacagccgct ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc 1140

gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcgga gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc 1200

gccgtgctgc agagttctgg cctgtatagc ctgagcagcg tggtcaccgt gccttctagc 1260

agcctgggca cccagaccta catctgcaac gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg 1320

gacaagaagg tggagcccaa gagctgcgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 1380

cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 1440

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 1500

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 1560

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 1620

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc 1680

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg 1740

cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tctcgtgcgc agtcaaaggc 1800

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1860

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc 1920

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1980

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 2028

<210> 145
<211> 676
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc [anti-FAP (28H1)]2

<400> 145

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

```
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130                 135                 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

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

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly
    210                 215                 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
                245                 250                 255

Phe Thr Phe Ser Ser His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
            260                 265                 270

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr
        275                 280                 285

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
    290                 295                 300

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
305                 310                 315                 320

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp
                325                 330                 335

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
            340                 345                 350

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
355                 360                 365

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
    370                 375                 380
```

```
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
385                 390                 395                 400

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
405                 410                 415

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
            420                 425                 430

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
435                 440                 445

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
    450                 455                 460

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
465                 470                 475                 480

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
                485                 490                 495

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
            500                 505                 510

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
        515                 520                 525

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
    530                 535                 540

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
545                 550                 555                 560

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
                565                 570                 575

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
580                 585                 590

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
        595                 600                 605

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
    610                 615                 620

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
625                 630                 635                 640

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
645                 650                 655
```

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
660 665 670

Ser Pro Gly Lys
675

<210> 146
<211> 2514
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-254) - FAP (VHCL*) cadena de botón de Fc

<400> 146
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 600

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 660

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 720

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 780

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 840

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 900

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 960

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 1020

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 1080

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaaggggggc 1140

ggaggttccg gaggcggagg atctgaggtg cagctgctgg aatccggcgg aggcctggtg 1200

cagcctggcg gatctctgag actgtcctgc gccgcctccg gcttcacctt ctcctcccac 1260

gccatgtcct gggtccgaca ggctcctggc aaaggcctgg aatgggtgtc cgccatctgg 1320

gcctccggcg agcagtacta cgccgactct gtgaagggcc ggttcaccat ctcccgggac 1380

aactccaaga acaccctgta cctgcagatg aactccctgc gggccgagga caccgccgtg 1440

tactactgtg ccaagggctg gctgggcaac ttcgactact ggggccaggg caccctggtc 1500

accgtgtcca gcgctagcgt ggctgcacca tctgtcttta tcttcccacc cagcgaccgg 1560

aagctgaagt ctggcacagc cagcgtcgtg tgcctgctga ataacttcta cccccgcgag 1620

gccaaggtgc agtggaaggt ggacaatgcc ctgcagagcg gcaacagcca ggaaagcgtg 1680

accgagcagg acagcaagga ctccacctac agcctgagca gcaccctgac cctgagcaag 1740

gccgactacg agaagcacaa ggtgtacgcc tgcgaagtga cccaccaggg cctgtctagc 1800

cccgtgacca agagcttcaa ccggggcgag tgcgacaaga cccacacctg tcctccatgc 1860

cctgcccctg aagctgctgg cggccctagc gtgttcctgt tccccccaaa gcccaaggac 1920

accctgatga tcagccggac ccctgaagtg acctgcgtgg tggtggatgt gtcccacgag 1980

gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg gacggcgtgg aagtgcacaa tgccaagacc 2040

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 2100

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc 2160

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 2220

accctgcccc catgccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc 2280

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 2340

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 2400

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 2460

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 2514

<210> 147
<211> 1221
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (71-254) -FAP (VLCH1*)

<400> 147
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggct ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggccggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

agactgggag tgcatctgca cacagaggcc agagccaggc acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg cctgcctagc 540

cctagatctg aaggcggcgg aggttccgga ggcggaggat ctgagatcgt gctgacccag 600

tctcccggca ccctgagcct gagccctggc gagagagcca ccctgagctg cagagccagc 660

cagagcgtga gccggagcta cctggcctgg tatcagcaga agcccggcca ggcccccaga 720

ctgctgatca tcggcgccag cacccgggcc accggcatcc ccgatagatt cagcggcagc 780

ggctccggca ccgacttcac cctgaccatc agccggctgg aacccgagga cttcgccgtg 840

tactactgcc agcagggcca ggtgatcccc cccaccttcg gccagggcac caaggtggaa 900

atcaagtcct ctgctagcac aaagggcccc agcgtgttcc ctctggcccc tagcagcaag 960

agcacatctg gcggaacagc cgccctgggc tgcctggtgg aagattactt ccccgagccc 1020

gtgaccgtgt cctggaattc tggcgccctg acaagcggcg tgcacacctt tccagccgtg 1080

ctgcagagca gcggcctgta ctctctgagc agcgtcgtga cagtgcccag cagctctctg 1140

ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac cacaagccca gcaacaccaa ggtggacgag 1200

aaggtggaac ccaagtcctg c 1221

<210> 148
<211> 838
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-254) - FAP (VHCL*) cadena de botón de Fc

<400> 148

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 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 Gly Ser Gly
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
385                 390                 395                 400

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
                405                 410                 415
```

```
Phe Ser Ser His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
420                 425                 430

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala
        435                 440                 445

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
    450                 455                 460

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
465                 470                 475                 480

Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
                485                 490                 495

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
500                 505                 510

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
        515                 520                 525

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
    530                 535                 540

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
545                 550                 555                 560

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
                565                 570                 575

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
580                 585                 590

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
        595                 600                 605

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
    610                 615                 620

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
625                 630                 635                 640

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
                645                 650                 655

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
            660                 665                 670

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
```

675 680 685

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
690 695 700

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
705 710 715 720

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
725 730 735

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
740 745 750

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
755 760 765

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
770 775 780

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
785 790 795 800

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
805 810 815

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
820 825 830

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
835

<210> 149
<211> 407
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (71-254) -FAP (VLCH1*)

<400> 149

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 Gly Ser Gly Gly Gly
180                 185                 190

Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
        195                 200                 205

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
    210                 215                 220

Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
225                 230                 235                 240

Leu Leu Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
                245                 250                 255

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
            260                 265                 270

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val
275                 280                 285

Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser
290                 295                 300

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
305                 310                 315                 320

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr
```

325 330 335

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
340 345 350

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
355 360 365

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
370 375 380

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu
385 390 395 400

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
405

<210> 150
<211> 2268
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (52-254) - CH1* cadena de botón de Fc

<400> 150
ccttgggctg tgtctggcgc tagagcctct cctggatctg ccgccagccc cagactgaga 60

gagggacctg agctgagccc cgatgatcct gccggactgc tggatctgag acagggcatg 120

ttcgcccagc tggtggccca gaacgtgctg ctgatcgatg gccccctgtc ctggtacagc 180

gatcctggac tggctggcgt gtcactgaca ggcggcctga gctacaaaga ggacaccaaa 240

gaactggtgg tggccaaggc cggcgtgtac tacgtgttct ttcagctgga actgcggaga 300

gtggtggccg gcgagggatc tggatctgtg tctctggccc tgcatctgca gcccctgaga 360

agcgctgctg gcgctgcagc tctggcactg acagtggatc tgcctcctgc cagctccgag 420

gcccggaata gcgcatttgg gtttcaaggc agactgctgc acctgtctgc cggccagagg 480

ctgggagtgc atctgcacac agaggccagg gctagacacg cctggcagct gacacagggc 540

gctacagtgc tgggcctgtt cagagtgacc cccgagattc agccggact gcccagccct 600

agatctgaag gcggcggagg aagcggaggc ggaggatccc cttgggctgt gtctggcgct 660

agagcctctc ctggatctgc cgccagcccc agactgagag agggacctga gctgagcccc 720

gatgatcctg ccggactgct ggacctgcgg cagggaatgt tcgctcagct ggtggctcag 780

aatgtgctgc tgattgacgg acctctgtcc tggtactccg accctggcct ggcaggggtg 840

tccctgactg ggggactgtc ctacaaagaa gatacaaaag aactggtggt ggctaaagct 900

ggggtgtact atgtgttttt tcagctggaa ctgaggcggg tggtggctgg ggagggctca 960

ggatctgtgt ccctggctct gcatctgcag cctctgcgct ctgctgctgg cgcagctgca 1020

ctggctctga ctgtggacct gccaccagcc tctagcgagg ccagaaacag cgccttcggg 1080

ttccaaggac ggctgctgca tctgagcgcc ggacagcgcc tgggagtgca tctgcatact 1140

gaagccagag cccggcatgc ttggcagctg acccaggggg caactgtgct gggactgttt 1200

cgcgtgacac ctgagatccc cgctggcctg cctagcccaa gaagtgaagg gggaggcgga 1260

tctggcggag ggggatctgc tagcaccaag ggcccctccg tgttcccctt ggcccccagc 1320

agcaagagca ccagcggcgg cacagccgct ctgggctgcc tggtcgagga ctacttcccc 1380

gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcgga gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc 1440

gccgtgctgc agagttctgg cctgtatagc ctgagcagcg tggtcaccgt gccttctagc 1500

agcctgggca cccagaccta catctgcaac gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg 1560

gacgagaagg tggagcccaa gagctgcgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 1620

cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 1680

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 1740

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 1800

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 1860

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc 1920

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1980

cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc 2040

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 2100

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 2160

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 2220

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 2268

<210> 151
<211> 960
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (52-254) -CL*

<400> 151
ccttgggctg tgtctggcgc tagagcctct cctggatctg ccgccagccc cagactgaga 60

gagggacctg agctgagccc cgatgatcct gccggactgc tggatctgag acagggcatg 120

ttcgcccagc tggtggccca gaacgtgctg ctgatcgatg gcccccctgtc ctggtacagc 180

gatcctggac tggctggcgt gtcactgaca ggcggcctga gctacaaaga ggacaccaaa 240

gaactggtgg tggccaaggc cggcgtgtac tacgtgttct ttcagctgga actgcggaga 300

gtggtggccg gcgagggatc tggatctgtg tctctggccc tgcatctgca gcccctgaga 360

agcgctgctg gcgctgcagc tctggcactg acagtggatc tgcctcctgc cagctccgag 420

gcccggaata gcgcatttgg gtttcaaggc aggctgctgc acctgtctgc cggccagagg 480

ctgggagtgc atctgcacac agaggccagg gctagacacg cctggcagct gacacagggc 540

gctacagtgc tgggcctgtt cagagtgacc cccgagattc agccggcct gccttctcca 600

agaagcgaag gcggaggcgg atctggcggc ggaggatctc gtacggtggc tgcaccatct 660

gtcttcatct tcccgccatc tgatcggaag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 720

ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 780

caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 840

ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 900

gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 960

<210> 152
<211> 2100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (80-254) - CH1* cadena de botón de Fc

<400> 152
gatcctgccg gcctgctgga tctgcggcag ggaatgtttg cccagctggt ggcccagaac 60

gtgctgctga tcgatggccc cctgagctgg tacagcgatc ctggactggc tggcgtgtca 120

ctgacaggcg gcctgagcta caaagaggac accaaagaac tggtggtggc caaggccggc 180

gtgtactacg tgttctttca gctggaactg cggagagtgg tggccggcga aggatctggc 240

tctgtgtctc tggccctgca tctgcagccc ctgagaagcg ctgctggcgc tgcagctctg 300

gcactgacag tggatctgcc tcctgccagc tccgaggccc ggaatagcgc atttgggttt 360

caaggcagac tgctgcacct gtctgccggc cagaggctgg gagtgcatct gcacacagag 420

gccagggcta gacacgcctg gcagctgaca cagggcgcta cagtgctggg cctgttcaga 480

gtgacccccg agattccagc cggactgccc agccctagat ctgaaggcgg cggaggaagc 540

ggaggcggag gatccgaccc agctggactg ctggacctgc ggcagggaat gttcgctcag 600

ctggtggctc agaatgtgct gctgattgac ggacctctgt cctggtactc cgaccctggc 660

ctggcagggg tgtccctgac tgggggactg tcctacaaag aagatacaaa agaactggtg 720

gtggctaaag ctggggtgta ctatgtgttt tttcagctgg aactgaggcg ggtggtggct 780

ggggagggct caggatctgt gtccctggct ctgcatctgc agcctctgcg ctctgctgct 840

ggcgcagctg cactggctct gactgtggac ctgccaccag cctctagcga ggccagaaac 900

agcgccttcg ggttccaagg acggctgctg catctgagcg ccggacagcg cctgggagtg 960

catctgcata ctgaagccag agcccggcat gcttggcagc tgacccaggg ggcaactgtg 1020

ctgggactgt ttcgcgtgac acctgagatc cccgctggcc tgcctagccc aagaagtgaa 1080

gggggaggcg gatctggcgg agggggatct gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc 1140

ctggccccca gcagcaagag caccagcggc ggcacagccg ctctgggctg cctggtcgag 1200

gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg 1260

cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc 1320

gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc tacatctgca acgtgaacca caagcccagc 1380

aacaccaagg tggacgagaa ggtggagccc aagagctgcg acaaaactca cacatgccca 1440

ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 1500

aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 1560

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1620

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1680

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1740

ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1800

gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc 1860

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1920

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1980

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 2040

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2100

<210> 153
<211> 876
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (80-254) -CL*

<400> 153
gatcctgccg gcctgctgga tctgcggcag ggaatgtttg cccagctggt ggcccagaac 60

gtgctgctga tcgatggccc cctgagctgg tacagcgatc ctggactggc tggcgtgtca 120

ctgacaggcg gcctgagcta caaagaggac accaaagaac tggtggtggc caaggccggc 180

gtgtactacg tgttctttca gctggaactg cggagagtgg tggccggcga aggatctggc 240

tctgtgtctc tggccctgca tctgcagccc ctgagaagcg ctgctggcgc tgcagctctg 300

gcactgacag tggatctgcc tcctgccagc tccgaggccc ggaatagcgc atttgggttt 360

caaggcaggc tgctgcacct gtctgccggc cagaggctgg gagtgcatct gcacacagag 420

gccagggcta gacacgcctg gcagctgaca cagggcgcta cagtgctggg cctgttcaga 480

gtgacccccg agattccagc cggcctgcct tctccaagaa gcgaaggcgg aggcggatct 540

ggcggcggag gatctcgtac ggtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat 600

cggaagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga 660

gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt 720

gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc 780

aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 840

tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgt 876

<210> 154
<211> 1317
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena KK de Fc DP47 ADN

<400> 154
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagcgctaa gaccaccccc 360

cctagcgtgt accctctggc ccctggatct gccgcccaga ccaacagcat ggtgaccctg 420

ggctgcctgg tgaagggcta cttccccgag cctgtgaccg tgacctggaa cagcggcagc 480

ctgagcagcg gcgtgcacac ctttccagcc gtgctgcaga gcgacctgta caccctgagc 540

agctccgtga ccgtgcctag cagcacctgg cccagccaga cagtgacctg caacgtggcc 600

caccctgcca gcagcaccaa ggtggacaag aaaatcgtgc cccgggactg cggctgcaag 660

ccctgcatct gcaccgtgcc cgaggtgtcc agcgtgttca tcttcccacc caagcccaag 720

gacgtgctga ccatcaccct gacccccaaa gtgacctgcg tggtggtggc catcagcaag 780

gacgaccccg aggtgcagtt ctcttggttt gtggacgacg tggaggtgca cacagcccag 840

acaaagcccc gggaggaaca gatcaacagc accttcagaa gcgtgtccga gctgcccatc 900

atgcaccagg actggctgaa cggcaaagaa ttcaagtgca gagtgaacag cgccgccttc 960

ggcgccccca tcgagaaaac catcagcaag accaagggca gacccaaggc ccccccaggtg 1020

tacaccatcc ccccacccaa aaaacagatg gccaaggaca aggtgtccct gacctgcatg 1080

atcaccaact ttttccccga ggacatcacc gtggagtggc agtggaatgg ccagcccgcc 1140

gagaactaca agaacaccca gcccatcatg aagaccgacg gcagctactt cgtgtacagc 1200

aagctgaacg tgcagaagtc caactgggag gccggcaaca ccttcacctg tagcgtgctg 1260

cacgagggcc tgcacaacca ccacaccgag aagtccctga gccactcccc cggcaag 1317

<210> 155
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera DP47 ADN

<400> 155
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc 300

caggggacca aagtggaaat caaacgtgcc gatgctgcac caactgtatc gattttccca 360

ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc 420

taccccaaag acatcaatgt caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgtc 480

ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcaccctc 540

acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag 600

acatcaactt cacccattgt caagagcttc aacaggaatg agtgt 645

<210> 156
<211> 439
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena KK de Fc DP47

<400> 156

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 Ser Gly Ser Gly 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

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 Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
115 120 125

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

```
Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser
145                 150                 155                 160

Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu
                165                 170                 175

Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser
180                 185                 190

Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val
        195                 200                 205

Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys
    210                 215                 220

Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225                 230                 235                 240

Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
                245                 250                 255

Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
            260                 265                 270

Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ile
        275                 280                 285

Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
    290                 295                 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
305                 310                 315                 320

Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys
                325                 330                 335

Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Lys Gln Met Ala Lys
            340                 345                 350

Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro Glu Asp
        355                 360                 365

Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
    370                 375                 380

Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
385                 390                 395                 400

Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
                405                 410                 415
```

Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
420 425 430

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435

<210> 157
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera DP47

<400> 157

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

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 Ala Asp Ala
100 105 110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
115 120 125

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

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 158
<211> 2298
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL mu dimérico (104-309, C160S) - CL cadena DD de Fc ADN

<400> 158
agaaccgagc ccagacccgc cctgaccatc accaccagcc ctaacctggg caccagagag 60

aacaacgccg accaagtgac ccccgtgtcc cacatcggct gccccaatac cacacagcag 120

ggcagccctg tgttcgccaa gctgctggcc aagaaccagg ccagcctgag caacaccacc 180

ctgaactggc acagccagga tggcgccgga agcagctatc tgagccaggg cctgagatac 240

gaagaggaca agaaagaact ggtggtggac agccctggcc tgtactacgt gttcctggaa 300

ctgaagctga gccccacctt caccaacacc ggccacaagg tgcagggctg ggtgtcactg 360

gtgctgcagg ccaaacccca ggtggacgac ttcgacaacc tggccctgac cgtggaactg 420

ttcccctgca gcatggaaaa caagctggtg gatcggagct ggtcccagct tctgctgctg 480

aaggccggac acagactgag cgtgggcctg agggcttatc tgcacggcgc ccaggacgcc 540

tacagagact gggagctgag ctaccccaac acaaccagct tcggcctgtt cctcgtgaag 600

cccgacaacc cttgggaagg cggcggaggc tccggaggag gcggatctag aacagagcct 660

cggcctgccc tgacaattac cacatccccc aatctgggca cccgggaaaa caatgcagat 720

caagtgacac ctgtgtctca tattgggtgc cccaacacta cccagcaggg gtccccagtg 780

tttgctaaac tgctggctaa aaatcaggcc tccctgtcta acacaacact gaattggcat 840

agtcaggacg gggctggcag cagctacctg tctcagggac tgcgctatga ggaagataag 900

aaagaactgg tggtggattc ccccggactg tactatgtgt ttctggaact gaaactgtcc 960

cctaccttta caaataccgg gcacaaagtg cagggatggg tgtccctggt gctgcaggct 1020

aagcctcagg tggacgattt tgataatctg gctctgacag tggaactgtt tccttgctct 1080

atggaaaaca aactggtgga ccgctcttgg agccagttgc tgctgctgaa agctggccac 1140

cggctgtctg tgggactgag agcatacctg catggggcac aggatgccta ccgggattgg 1200

gaactgtcct accctaacac tacttccttc ggactgttcc tcgtgaaacc tgataatccc 1260

tgggagggcg gaggcggaag tggcggaggg ggatccagag ctgatgctgc ccctaccgtg 1320

tccatcttcc cacccagcag cgagcagctg acatctgggg gagctagcgt cgtgtgcttc 1380

ctgaacaact tctaccccaa ggacatcaac gtgaagtgga agatcgacgg cagcgagcgg 1440

cagaacggcg tgctgaatag ctggaccgac caggacagca aggactccac ctacagcatg 1500

agcagcaccc tgaccctgac caaggacgag tacgagcggc acaacagcta cacatgcgag 1560

gccacccaca agaccagcac cagccccatc gtgaagtcct tcaaccggaa cgagtgcgtg 1620

cccagagact gcggctgcaa gccttgcatc tgcaccgtgc ctgaggtgtc cagcgtgttc 1680

atcttcccac ccaagcccaa ggacgtgctg accatcaccc tgacacccaa agtgacctgc 1740

gtggtggtgg ccatcagcaa ggatgacccc gaggtgcagt tcagttggtt cgtggacgac 1800

gtggaagtgc acaccgctca gaccaagccc agagaggaac agatcaacag caccttcaga 1860

agcgtgtccg agctgcccat catgcaccag gactggctga acggcaaaga attcaagtgc 1920

agagtgaaca gcgccgcctt tggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa gaccaagggc 1980

agacccaagg ccccccaggt gtacacaatc cccccaccca aagaacagat ggccaaggac 2040

aaggtgtccc tgacctgcat gatcaccaat ttcttcccag aggatatcac cgtggaatgg 2100

cagtggaacg gccagcccgc cgagaactac gacaacaccc agcctatcat ggacaccgac 2160

ggctcctact tcgtgtacag cgacctgaac gtgcagaagt ccaactggga ggccggcaac 2220

accttcacct gtagcgtgct gcacgagggc ctgcacaacc accacaccga gaagtccctg 2280

tcccacagcc ctggcaag 2298

<210> 159
<211> 954
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL mu monomérico (104-309, C160S) - CH1 ADN

<400> 159
agaaccgagc ccagacccgc cctgaccatc accaccagcc ctaacctggg caccagagag 60

aacaacgccg accaagtgac ccccgtgtcc cacatcggct gccccaatac cacacagcag 120

ggcagccctg tgttcgccaa gctgctggcc aagaaccagg ccagcctgag caacaccacc 180

ctgaactggc acagccagga tggcgccgga agcagctatc tgagccaggg cctgagatac 240

gaagaggaca agaaagaact ggtggtggac agccctggcc tgtactacgt gttcctggaa 300

ctgaagctga gccccacctt caccaacacc ggccacaagg tgcagggctg ggtgtcactg 360

gtgctgcagg ccaaacccca ggtggacgac ttcgacaacc tggccctgac cgtggaactg 420

ttcccctgca gcatggaaaa caagctggtg gatcggagct ggtcccagct tctgctgctg 480

aaggccggac acagactgag cgtgggcctg agggcttatc tgcacggcgc ccaggacgcc 540

tacagagact gggagctgag ctaccccaac acaaccagct tcggcctgtt cctcgtgaag 600

cccgacaacc cttgggaagg cggcggaggc tccggaggag gcggaagcgc taagaccacc 660

ccccccagcg tgtaccctct ggcccctgga tctgccgccc agaccaacag catggtgacc 720

ctgggctgcc tggtgaaggg ctacttcccc gagcctgtga ccgtgacctg gaacagcggc 780

agcctgagca gcggcgtgca cacctttcca gccgtgctgc agagcgacct gtacaccctg 840

agcagctccg tgaccgtgcc tagcagcacc tggcccagcc agacagtgac ctgcaacgtg 900

gcccaccctg ccagcagcac caaggtggac aagaaaatcg tgccccggga ctgc 954

<210> 160
<211> 766
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL mu dimérico (104-309, C160S) - CL cadena DD de Fc

<400> 160

Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu Thr Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu
1 5 10 15

Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp Gln Val Thr Pro Val Ser His Ile
20 25 30

Gly Cys Pro Asn Thr Thr Gln Gln Gly Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu
35 40 45

Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu Ser Asn Thr Thr Leu Asn Trp His
50 55 60

Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser Tyr Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr
65 70 75 80

Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val Val Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr
85 90 95

Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly His
100 105 110

Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu Val Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val
115 120 125

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

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

Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val Gly Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly
165 170 175

Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp Glu Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr
180 185 190

Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys Pro Asp Asn Pro Trp Glu Gly Gly
195 200 205

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu
    210                 215                 220

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

Gln Val Thr Pro Val Ser His Ile Gly Cys Pro Asn Thr Thr Gln Gln
245                 250                 255

Gly Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu
            260                 265                 270

Ser Asn Thr Thr Leu Asn Trp His Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser
        275                 280                 285

Tyr Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val
290                 295                 300

Val Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser
305                 310                 315                 320

Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly His Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu
                325                 330                 335

Val Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val Asp Asp Phe Asp Asn Leu Ala Leu
            340                 345                 350

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

Ser Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val
    370                 375                 380

Gly Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp
385                 390                 395                 400

Glu Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys
                405                 410                 415

Pro Asp Asn Pro Trp Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
420                 425                 430

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
        435                 440                 445

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
    450                 455                 460

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
465                 470                 475                 480
```

```
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
485                 490                 495

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
500                 505                 510

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
        515                 520                 525

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Val Pro Arg Asp Cys
    530                 535                 540

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
545                 550                 555                 560

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
565                 570                 575

Lys Val Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
580                 585                 590

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
        595                 600                 605

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
    610                 615                 620

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
625                 630                 635                 640

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
645                 650                 655

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
            660                 665                 670

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
        675                 680                 685

Thr Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
    690                 695                 700

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Asp Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
705                 710                 715                 720

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
725                 730                 735

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
            740                 745                 750
```

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
755 760 765

<210> 161
<211> 318
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL mu monomérico (104-309, C160S) - CH1

<400> 161

Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu Thr Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu
1 5 10 15

Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp Gln Val Thr Pro Val Ser His Ile
20 25 30

Gly Cys Pro Asn Thr Thr Gln Gln Gly Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu
35 40 45

Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu Ser Asn Thr Thr Leu Asn Trp His
50 55 60

Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser Tyr Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr
65 70 75 80

Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val Val Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr
85 90 95

Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly His
100 105 110

Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu Val Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val
115 120 125

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

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

Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val Gly Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly
165 170 175

Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp Glu Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr
180 185 190

Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys Pro Asp Asn Pro Trp Glu Gly Gly
195 200 205

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
210 215 220

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
225 230 235 240

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
245 250 255

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
260 265 270

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
275 280 285

Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
290 295 300

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
305 310 315

<210> 162
<211> 1341
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc anti-FAP (4B9) ADN

<400> 162
gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc 120

cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300

ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctggtca cagtgtccag cgctagcacc 360

aagggcccct ccgtgttccc cctggccccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc 420

gctctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaacagc 480

ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagttc tggcctgtat 540

agcctgagca gcgtggtcac cgtgccttct agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1080

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 163
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera anti-FAP (4B9) ADN

<400> 163
gagatcgtgc tgacccagtc ccccggcacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgtcctgca gagcctccca gtccgtgacc tcctcctacc tcgcctggta tcagcagaag 120

cccggccagg cccctcggct gctgatcaac gtgggcagtc ggagagccac cggcatccct 180

gaccggttct ccggctctgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccggctggaa 240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggcatca tgctgccccc caccttggc 300

cagggcacca aggtggaaat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 164
<211> 447
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc anti-FAP (4B9)

<400> 164

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

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 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 Lys
435 440 445

<210> 165
<211> 2166
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-254) - CL cadena de botón de Fc ADN

<400> 165
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 600

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 660

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 720

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 780

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 840

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 900

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 960

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 1020

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 1080

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaaggggggc 1140

ggaggttccg gagggggagg atctcgtacg gtggccgctc cctccgtgtt tatctttccc 1200

ccatccgatg aacagctgaa aagcggcacc gcctccgtcg tgtgtctgct gaacaatttt 1260

taccctaggg aagctaaagt gcagtggaaa gtggataacg cactgcagtc cggcaactcc 1320

caggaatctg tgacagaaca ggactccaag gacagcacct actccctgtc ctccaccctg 1380

acactgtcta aggctgatta tgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 1440

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtgacaa gacccacacc 1500

tgtccccctt gtcctgcccc tgaagctgct ggcggccctt ctgtgttcct gttcccccca 1560

aagcccaagg acaccctgat gatcagccgg acccccgaag tgacctgcgt ggtggtggat 1620

gtgtcccacg aggaccctga agtgaagttc aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac 1680

aatgccaaga ccaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1740

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1800

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1860

ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1920

tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1980

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 2040

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 2100

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 2160

ggtaaa 2166

<210> 166
<211> 891
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 166
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggct ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggccggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

agactgggag tgcatctgca cacagaggcc agagccaggc acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg cctgcctagc 540

cctagatctg aaggcggcgg aggttccgga ggcggaggat ctgctagcac caaaggccct 600

tccgtgtttc ctctggctcc tagctccaag tccacctctg gaggcaccgc tgctctcgga 660

tgcctcgtga aggattattt tcctgagcct gtgacagtgt cctggaatag cggagcactg 720

acctctggag tgcatacttt ccccgctgtg ctgcagtcct ctggactgta cagcctgagc 780

agcgtggtga cagtgcccag cagcagcctg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac 840

cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaggtggaac ccaagtcttg t 891

<210> 167
<211> 2502
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc anti-FAP (4B9) fusionada a 4-1BBL hu dimérico (71-254) ADN

<400> 167
gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc 120

cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300

ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctggtca cagtgtccag cgctagcacc 360

aagggcccct ccgtgttccc cctggccccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc 420

gctctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaacagc 480

ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagttc tggcctgtat 540

agcctgagca gcgtggtcac cgtgccttct agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1080

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctccgggtgg aggcggcgga agcggaggag gaggatccag agagggccct 1380

gagctgagcc ccgatgatcc tgctggactg ctggacctgc ggcagggcat gtttgctcag 1440

ctggtggccc agaacgtgct gctgatcgat ggccccctgt cctggtacag cgatcctgga 1500

ctggctggcg tgtcactgac aggcggcctg agctacaaag aggacaccaa agaactggtg 1560

gtggccaagg ccggcgtgta ctacgtgttc tttcagctgg aactgcggag agtggtggcc 1620

ggcgaaggat ctggctctgt gtctctggcc ctgcatctgc agcctctgag aagcgctgct 1680

ggcgctgcag ctctggcact gacagtggat ctgcctcctg ccagctccga ggcccggaat 1740

agcgcatttg ggtttcaagg caggctgctg cacctgtctg ccggccagag gctgggagtg 1800

catctgcaca cagaggccag ggctagacac gcctggcagc tgacacaggg cgctacagtg 1860

ctgggcctgt tcagagtgac ccccgagatt ccagccggcc tgccttctcc aagaagcgaa 1920

ggcggaggcg gatctggcgg cggaggatct agagagggac ccgaactgtc ccctgacgat 1980

ccagccgggc tgctggatct gagacaggga atgttcgccc agctggtggc tcagaatgtg 2040

ctgctgattg acggacctct gagctggtac tccgacccag ggctggcagg ggtgtccctg 2100

actgggggac tgtcctacaa agaagataca aaagaactgg tggtggctaa agctggggtg 2160

tactatgtgt tttttcagct ggaactgagg cgggtggtgg ctggggaggg ctcaggatct 2220

gtgtccctgg ctctgcatct gcagccactg cgctctgctg ctggcgcagc tgcactggct 2280

ctgactgtgg acctgccacc agcctctagc gaggccagaa acagcgcctt cgggttccaa 2340

ggacgcctgc tgcatctgag cgccggacag cgcctgggag tgcatctgca tactgaagcc 2400

agagcccggc atgcttggca gctgactcag ggggcaactg tgctgggact gtttcgcgtg 2460

acacctgaga tccctgccgg actgccaagc cctagatcag aa 2502

<210> 168
<211> 1920
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de botón de Fc anti-FAP (4B9) fusionada a 4-1BBL hu monomérico (71-254) ADN

<400> 168
gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc 120

cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300

ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctggtca cagtgtccag cgctagcacc 360

aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccct gcagagatga gctgaccaag 1080

aaccaggtgt ccctgtggtg tctggtcaag ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggag 1140

tgggagagca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 1200

gacggcagct tcttcctgta ctccaaactg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 1260

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1320

ctgagcctga gccccggcgg aggcggcgga agcggaggag gaggatccag agagggccct 1380

gagctgagcc ccgatgatcc tgctggactg ctggacctgc ggcagggcat gtttgctcag 1440

ctggtggccc agaacgtgct gctgatcgat ggcccccctgt cctggtacag cgatcctgga 1500

ctggctggcg tgtcactgac aggcggcctg agctacaaag aggacaccaa agaactggtg 1560

gtggccaagg ccggcgtgta ctacgtgttc tttcagctgg aactgcggag agtggtggcc 1620

ggcgaaggat ctggctctgt gtctctggcc ctgcatctgc agcctctgag aagcgctgct 1680

ggcgctgcag ctctggcact gacagtggat ctgcctcctg ccagctccga ggcccggaat 1740

agcgcatttg ggtttcaagg caggctgctg cacctgtctg ccggccagag gctgggagtg 1800

catctgcaca cagaggccag ggctagacac gcctggcagc tgacacaggg cgctacagtg 1860

ctgggcctgt tcagagtgac ccccgagatt ccagccggcc tgccttctcc aagaagcgaa 1920

<210> 169
<211> 2130
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL* cadena de botón de Fc ADN

<400> 169

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg actgggaggc 540

ggcggatctg gcggcggagg atctagagaa ggacccgagc tgtcccctga cgatccagcc 600

gggctgctgg atctgagaca gggaatgttc gcccagctgg tggctcagaa tgtgctgctg 660

attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggctgg caggggtgtc cctgactggg 720

ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctggtggtgg ctaaagctgg ggtgtactat 780

gtgtttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 840

ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gcagcagggg ctgcagcact ggccctgact 900

gtggacctgc ccccagcttc ttccgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 960

ctgctgcatc tgagcgccgg acagcgcctg ggagtgcatc tgcatactga agccagagcc 1020

cggcatgctt ggcagctgac tcaggggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 1080

gagatccccg ctggactggg cggaggcggt tccggagggg gaggatctcg tacggtggct 1140

gcaccatctg tctttatctt cccacccagc gaccggaagc tgaagtctgg cacagccagc 1200

gtcgtgtgcc tgctgaataa cttctacccc cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac 1260

aatgccctgc agagcggcaa cagccaggaa agcgtgaccg agcaggacag caaggactcc 1320

acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg 1380

tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg tctagccccg tgaccaagag cttcaaccgg 1440

ggcgagtgcg acaagaccca cacctgtcct ccatgccctg cccctgaagc tgctggcggc 1500

cctagcgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggacccct 1560

gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 1620

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac 1680

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1740

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1800

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1860

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1920

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1980

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 2040

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 2100

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2130

<210> 170
<211> 873
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1* ADN

<400> 170
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg actgggaggc 540

ggaggttccg gaggcggagg atctgctagc acaaagggcc ccagcgtgtt ccctctggcc 600

cctagcagca agagcacatc tggcggaaca gccgccctgg gctgcctggt ggaagattac 660

ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaat tctggcgccc tgacaagcgg cgtgcacacc 720

tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg tactctctga gcagcgtcgt gacagtgccc 780

agcagctctc tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc 840

aaggtggacg agaaggtgga acccaagtcc tgc 873

<210> 171
<211> 2130
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL cadena de botón de Fc ADN

<400> 171
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg actgggaggc 540

ggcggatctg gcggcggagg atctagagaa ggacccgagc tgtcccctga cgatccagcc 600

gggctgctgg atctgagaca gggaatgttc gcccagctgg tggctcagaa tgtgctgctg 660

attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggctgg caggggtgtc cctgactggg 720

ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctggtggtgg ctaaagctgg ggtgtactat 780

gtgttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 840

ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gcagcagggg ctgcagcact ggccctgact 900

gtggacctgc ccccagcttc ttccgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 960

ctgctgcatc tgagcgccgg acagcgcctg ggagtgcatc tgcatactga agccagagcc 1020

cggcatgctt ggcagctgac tcaggggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 1080

gagatccccg ctggactggg cggaggcggt tccggagggg gaggatctcg tacggtggcc 1140

gctccctccg tgtttatctt tcccccatcc gatgaacagc tgaaaagcgg caccgcctcc 1200

gtcgtgtgtc tgctgaacaa tttttaccct agggaagcta aagtgcagtg gaaagtggat 1260

aacgcactgc agtccggcaa ctcccaggaa tctgtgacag aacaggactc caaggacagc 1320

acctactccc tgtcctccac cctgacactg tctaaggctg attatgagaa acacaaagtc 1380

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 1440

ggagagtgtg acaagaccca cacctgtccc ccttgtcctg cccctgaagc tgctggcggc 1500

ccttctgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 1560

gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 1620

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac 1680

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1740

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1800

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1860

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1920

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1980

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 2040

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 2100

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2130

<210> 172
<211> 873
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1 ADN

<400> 172
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg actgggaggc 540

ggaggttccg gaggcggagg atctgctagc accaaaggcc cttccgtgtt tcctctggct 600

cctagctcca agtccacctc tggaggcacc gctgctctcg gatgcctcgt gaaggattat 660

tttcctgagc ctgtgacagt gtcctggaat agcggagcac tgacctctgg agtgcatact 720

ttccccgctg tgctgcagtc ctctggactg tacagcctga gcagcgtggt gacagtgccc 780

agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc 840

aaggtggaca agaaggtgga acccaagtct tgt 873

<210> 173
<211> 710
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL cadena de botón de Fc

<400> 173

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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 Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
    370                 375                 380

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> 174
<211> 291
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (71-248) - CH1

<400> 174

```
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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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 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> 175
<211> 2466
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc anti-FAP (4B9) fusionada a 4-1BBL hu dimérico (71-248) ADN

<400> 175
gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc 120

cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300

ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctggtca cagtgtccag cgctagcacc 360

aagggcccct ccgtgttccc cctggccccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc 420

gctctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaacagc 480

ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagttc tggcctgtat 540

agcctgagca gcgtggtcac cgtgccttct agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1080

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctccgggtgg aggcggcgga agcggaggag gaggatccag agagggccct 1380

gagctgagcc ccgatgatcc tgctggactg ctggacctgc ggcagggcat gtttgctcag 1440

ctggtggccc agaacgtgct gctgatcgat ggcccctgt cctggtacag cgatcctgga 1500

ctggctggcg tgtcactgac aggcggcctg agctacaaag aggacaccaa agaactggtg 1560

gtggccaagg ccggcgtgta ctacgtgttc tttcagctgg aactgcggag agtggtggcc 1620

ggcgaaggat ctggctctgt gtctctggcc ctgcatctgc agcctctgag aagcgctgct 1680

ggcgctgcag ctctggcact gacagtggat ctgcctcctg ccagctccga ggcccggaat 1740

agcgcatttg ggtttcaagg caggctgctg cacctgtctg ccggccagag gctgggagtg 1800

catctgcaca cagaggccag ggctagacac gcctggcagc tgacacaggg cgctacagtg 1860

ctgggcctgt tcagagtgac ccccgagatt ccagccggcc tgggcggagg cggatctggc 1920

ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg tcccctgacg atccagccgg gctgctggat 1980

ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct 2040

ctgagctggt actccgaccc agggctggca ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac 2100

aaagaagata caaaagaact ggtggtggct aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag 2160

ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat 2220

ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca 2280

ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg 2340

agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg 2400

cagctgactc agggggcaac tgtgctggga ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc 2460

ggactg 2466

<210> 176
<211> 1902
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de botón de Fc anti-FAP (4B9) fusionada a 4-1BBL hu monomérico (71-248) ADN

<400> 176
gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc 120

cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300

ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctggtca cagtgtccag cgctagcacc 360

aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccct gcagagatga gctgaccaag 1080

aaccaggtgt ccctgtggtg tctggtcaag ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggag 1140

tgggagagca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 1200

gacggcagct tcttcctgta ctccaaactg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 1260

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1320

ctgagcctga gccccggcgg aggcggcgga agcggaggag gaggatccag agagggccct 1380

gagctgagcc ccgatgatcc tgctggactg ctggacctgc ggcagggcat gtttgctcag 1440

ctggtggccc agaacgtgct gctgatcgat ggccccctgt cctggtacag cgatcctgga 1500

ctggctggcg tgtcactgac aggcggcctg agctacaaag aggacaccaa agaactggtg 1560

gtggccaagg ccggcgtgta ctacgtgttc tttcagctgg aactgcggag agtggtggcc 1620

ggcgaaggat ctggctctgt gtctctggcc ctgcatctgc agcctctgag aagcgctgct 1680

ggcgctgcag ctctggcact gacagtggat ctgcctcctg ccagctccga ggcccggaat 1740

agcgcatttg ggtttcaagg caggctgctg cacctgtctg ccggccagag gctgggagtg 1800

catctgcaca cagaggccag ggctagacac gcctggcagc tgacacaggg cgctacagtg 1860

ctgggcctgt tcagagtgac ccccgagatt ccagccggcc tg 1902

<210> 177
<211> 2496
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc DP47 fusionada a 4-1BBL hu dimérico (71-254) ADN

<400> 177
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360

ccctccgtgt tccccctggc ccccagcagc aagagcacca gcggcggcac agccgctctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc 480

ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gttctggcct gtatagcctg 540

agcagcgtgg tcaccgtgcc ttctagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgcgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgtg caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tcgtgagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320

ctgtctccgg gtggaggcgg cggaagcgga ggaggaggat ccagagaggg ccctgagctg 1380

agccccgatg atcctgctgg actgctggac ctgcggcagg gcatgtttgc tcagctggtg 1440

gcccagaacg tgctgctgat cgatggcccc ctgtcctggt acagcgatcc tggactggct 1500

ggcgtgtcac tgacaggcgg cctgagctac aaagaggaca ccaaagaact ggtggtggcc 1560

aaggccggcg tgtactacgt gttctttcag ctggaactgc ggagagtggt ggccggcgaa 1620

ggatctggct ctgtgtctct ggccctgcat ctgcagcctc tgagaagcgc tgctggcgct 1680

gcagctctgg cactgacagt ggatctgcct cctgccagct ccgaggcccg gaatagcgca 1740

tttgggtttc aaggcaggct gctgcacctg tctgccggcc agaggctggg agtgcatctg 1800

cacacagagg ccagggctag acacgcctgg cagctgacac agggcgctac agtgctgggc 1860

ctgttcagag tgacccccga gattccagcc ggcctgcctt ctccaagaag cgaaggcgga 1920

ggcggatctg gcggcggagg atctagagag ggacccgaac tgtcccctga cgatccagcc 1980

gggctgctgg atctgagaca gggaatgttc gcccagctgg tggctcagaa tgtgctgctg 2040

attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggctgg caggggtgtc cctgactggg 2100

ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctggtggtgg ctaaagctgg ggtgtactat 2160

gtgttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 2220

ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gctgctggcg cagctgcact ggctctgact 2280

gtggacctgc caccagcctc tagcgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 2340

ctgctgcatc tgagcgccgg acagcgcctg ggagtgcatc tgcatactga agccagagcc 2400

cggcatgctt ggcagctgac tcaggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 2460

gagatccctg ccggactgcc aagccctaga tcagaa 2496

<210> 178
<211> 1914
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de botón de Fc DP47 fusionada a 4-1BBL hu monomérico (71-254) ADN

<400> 178
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360

ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480

ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccctgcagag atgagctgac caagaaccag 1080

gtgtccctgt ggtgtctggt caagggcttc taccccagcg atatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaacggcc agcctgagaa caactacaag accacccccc ctgtgctgga cagcgacggc 1200

agcttcttcc tgtactccaa actgaccgtg gacaagagcc ggtggcagca gggcaacgtg 1260

ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acacccagaa gtccctgagc 1320

ctgagccccg gcggaggcgg cggaagcgga ggaggaggat ccagagaggg ccctgagctg 1380

agccccgatg atcctgctgg actgctggac ctgcggcagg gcatgtttgc tcagctggtg 1440

gcccagaacg tgctgctgat cgatggcccc ctgtcctggt acagcgatcc tggactggct 1500

ggcgtgtcac tgacaggcgg cctgagctac aaagaggaca ccaaagaact ggtggtggcc 1560

aaggccggcg tgtactacgt gttctttcag ctggaactgc ggagagtggt ggccggcgaa 1620

ggatctggct ctgtgtctct ggccctgcat ctgcagcctc tgagaagcgc tgctggcgct 1680

gcagctctgg cactgacagt ggatctgcct cctgccagct ccgaggcccg gaatagcgca 1740

tttgggtttc aaggcaggct gctgcacctg tctgccggcc agaggctggg agtgcatctg 1800

cacacagagg ccagggctag acacgcctgg cagctgacac agggcgctac agtgctgggc 1860

ctgttcagag tgacccccga gattccagcc ggcctgcctt ctccaagaag cgaa 1914

<210> 179
<211> 834
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc DP47 fusionada a 4-1BBL hu dimérico (71-254)

<400> 179

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

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 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 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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 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

Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg
820                 825                 830
```

Ser Glu

<210> 180
<211> 640
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de botón de Fc DP47 fusionada 4-1BBL hu monomérico (71-254)

<400> 180

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

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

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 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> 181
<211> 1335
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada DP47 (PGLALA huIgG1) ADN

<400> 181
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360

ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480

ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320

ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 182
<211> 445
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada DP47 (PGLALA huIgG1)

<400> 182

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 Ser Gly Ser Gly 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

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

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 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
            340                 345                 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu 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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
                405                 410                 415

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> 183
<211> 189
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (71-254) más conector (G4S)1

<400> 183

```
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 Gly Ser
180 185

<210> 184
<211> 188
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (71-248) más conector (G4S)2

<400> 184

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
180 185

<210> 185
<211> 183
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu monomérico (71-248) más conector (G4S)1

<400> 185

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 Gly Gly Gly Gly Ser
180

<210> 186
<211> 1602
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> antígeno CD19 hu cadena de botón de Fc marca avi ADN

<400> 186

cccgaggaac ccctggtcgt gaaggtggaa gagggcgaca atgccgtgct gcagtgcctg 60

aagggcacct ccgatggccc tacccagcag ctgacctggt ccagagagag ccccctgaag 120

cccttcctga agctgtctct gggcctgcct ggcctgggca tccatatgag gcctctggcc 180

atctggctgt tcatcttcaa cgtgtcccag cagatgggcg gcttctacct gtgtcagcct 240

ggcccccccat ctgagaaggc ttggcagcct ggctggaccg tgaacgtgga aggatccggc 300

gagctgttcc ggtggaacgt gtccgatctg ggcggcctgg gatgcggcct gaagaacaga 360

tctagcgagg gccccagcag ccccagcggc aaactgatga gccccaagct gtacgtgtgg 420

gccaaggaca gacccgagat ctgggagggc gagcctcctt gcctgccccc tagagacagc 480

ctgaaccaga gcctgagcca ggacctgaca atggcccctg gcagcacact gtggctgagc 540

tgtggcgtgc cacccgactc tgtgtctaga ggccctctga gctggaccca cgtgcaccct 600

aagggcccta agagcctgct gagcctggaa ctgaaggacg acaggcccgc cagagatatg 660

tgggtcatgg aaaccggcct gctgctgcct agagccacag cccaggatgc cggcaagtac 720

tactgccaca gaggcaacct gaccatgagc ttccacctgg aaatcaccgc cagacccgtg 780

ctgtggcact ggctgctgag aacaggcggc tggaaggtcg acgctagcgg tggtagtccg 840

acacctccga cacccggggg tggttctgca gacaaaactc acacatgccc accgtgccca 900

gcacctgaag ccgcaggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 960

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 1020

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 1080

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1140

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggagcc 1200

cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1260

ctgccccccat gccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgtggtg cctggtcaaa 1320

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1380

tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1440

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1500

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atccggaggc 1560

ctgaacgaca tcttcgaggc ccagaagatt gaatggcacg ag 1602

<210> 187
<211> 534
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> antígeno CD19 hu cadena de botón de Fc marca avi

<400> 187

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

```
Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr
            20                  25                  30

Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly
        35                  40                  45

Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe
50                  55                  60

Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
65                  70                  75                  80

Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val
                85                  90                  95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
            100                 105                 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
        115                 120                 125

Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
    130                 135                 140

Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser
145                 150                 155                 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
                165                 170                 175

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
            180                 185                 190

Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser
        195                 200                 205

Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu
    210                 215                 220

Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr
225                 230                 235                 240

Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr
                245                 250                 255

Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys
            260                 265                 270

Val Asp Ala Ser Gly Gly Ser Pro Thr Pro Pro Thr Pro Gly Gly Gly
```

275 280 285

Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
290 295 300

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
305 310 315 320

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
325 330 335

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
340 345 350

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
355 360 365

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
370 375 380

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala
385 390 395 400

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
405 410 415

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
420 425 430

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
435 440 445

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
450 455 460

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
465 470 475 480

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
485 490 495

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
500 505 510

Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
515 520 525

Lys Ile Glu Trp His Glu
530

<210> 188
<211> 1605
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> antígeno CD19 cy cadena de botón de Fc marca avi ADN

<400> 188
ccccaggaac ccctggtcgt gaaggtggaa gagggcgaca atgccgtgct ccagtgcctg 60

gaaggcacct ccgatggccc tacacagcag ctcgtgtggt gcagagacag ccccttcgag 120

cccttcctga acctgtctct gggcctgcct ggcatgggca tcagaatggg ccctctgggc 180

atctggctgc tgatcttcaa cgtgtccaac cagaccggcg gcttctacct gtgtcagcct 240

ggcctgccaa gcgagaaggc ttggcagcct ggatggaccg tgtccgtgga aggatctggc 300

gagctgttcc ggtggaacgt gtccgatctg ggcggcctgg gatgcggcct gaagaacaga 360

agcagcgagg gccctagcag ccccagcggc aagctgaata gcagccagct gtacgtgtgg 420

gccaaggaca gacccgagat gtgggagggc gagcctgtgt gtggcccccc tagagatagc 480

ctgaaccaga gcctgagcca ggacctgaca atggcccctg gcagcacact gtggctgagc 540

tgtggcgtgc cacccgactc tgtgtccaga ggccctctga gctggacaca cgtgcggcca 600

aagggcccta agagcagcct gctgagcctg gaactgaagg acgaccggcc cgaccgggat 660

atgtgggtgg tggatacagg cctgctgctg accagagcca cagcccagga tgccggcaag 720

tactactgcc acagaggcaa ctggaccaag agcttttacc tggaaatcac cgccagaccc 780

gccctgtggc actggctgct gagaatcgga ggctggaagg tcgacgctag cggtggtagt 840

ccgacacctc cgacacccgg gggtggttct gcagacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 900

ccagcacctg aagccgcagg gggaccgtca gtcttcctct tcccccccaaa acccaaggac 960

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa 1020

gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1080

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1140

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcgga 1200

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1260

accctgcccc catgccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc 1320

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1380

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1440

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1500

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatccgga 1560

ggcctgaacg acatcttcga ggcccagaag attgaatggc acgag 1605

<210> 189
<211> 535
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> antígeno CD19 cy cadena de botón de Fc marca avi

<400> 189

Pro Gln Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val
1 5 10 15

Leu Gln Cys Leu Glu Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Val
20 25 30

Trp Cys Arg Asp Ser Pro Phe Glu Pro Phe Leu Asn Leu Ser Leu Gly
35 40 45

Leu Pro Gly Met Gly Ile Arg Met Gly Pro Leu Gly Ile Trp Leu Leu
50 55 60

Ile Phe Asn Val Ser Asn Gln Thr Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
65 70 75 80

Gly Leu Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Ser Val
85 90 95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
115 120 125

Ser Gly Lys Leu Asn Ser Ser Gln Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
130 135 140

Pro Glu Met Trp Glu Gly Glu Pro Val Cys Gly Pro Pro Arg Asp Ser
145 150 155 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
165 170 175

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
180 185 190

Leu Ser Trp Thr His Val Arg Pro Lys Gly Pro Lys Ser Ser Leu Leu
195 200 205

Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Asp Arg Asp Met Trp Val Val
210 215 220

Asp Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys
225 230 235 240

```
Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Trp Thr Lys Ser Phe Tyr Leu Glu Ile
                245                 250                 255

Thr Ala Arg Pro Ala Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Ile Gly Gly Trp
            260                 265                 270

Lys Val Asp Ala Ser Gly Gly Ser Pro Thr Pro Pro Thr Pro Gly Gly
        275                 280                 285

Gly Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
    290                 295                 300

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
305                 310                 315                 320

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
                325                 330                 335

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
            340                 345                 350

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
        355                 360                 365

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
    370                 375                 380

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
385                 390                 395                 400

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
                405                 410                 415

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
            420                 425                 430

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
        435                 440                 445

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
    450                 455                 460

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
465                 470                 475                 480

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
                485                 490                 495

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
            500                 505                 510
```

Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala
515 520 525

Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
530 535

<210> 190
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L1 CD19 humanizado (8B8)

<400> 190

Asn Ser Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 191
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-H2 CD19 humanizado (8B8)

<400> 191

Lys Phe Asn Gly
1

<210> 192
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-H2 var.1 a 9 CD19 humanizado (8B8)

<400> 192

Thr Glu Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met
1 5 10

<210> 193
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L1 var.5 CD19 humanizado (8B8)

<400> 193

Leu Glu Asn Pro Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 194
<211> 8

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L1 var.9 CD19 humanizado (8B8)

<400> 194

Leu Glu Asn Pro Ser Gly Asn Thr
1 5

<210> 195
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 195

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 196
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 196

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

Gly

<210> 197
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 197

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

<210> 198
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 198

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

<210> 199
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 199

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 200
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 200

Leu Gln Leu Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 201
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 201

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 Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 202
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 202

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 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

<210> 203
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 203
caggtccagc tggtgcagtc cggcgccgag gtcaagaaac ccggggcttc tgtgaaggtt 60

tcatgcaagg caagcggata caccttcacc gactatatca tgcattgggt caggcaggcc 120

cctggccaag gtctcgaatg gatgggctac attaacccat ataatgatgg ctccaaatac 180

accgagaagt ttcagggaag agtcactatg acatctgaca ccagtatcag cactgcttac 240

atggagctgt cccgccttcg gtctgatgac accgcagtgt attactgtgc caggggcaca 300

tattactacg gctcagctct gttcgactat tgggggcagg gaaccacagt aaccgtgagc 360

tccgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 204
<211> 657
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 204
gacatcgtca tgacccagac acccctgtcc ctctctgtga cccctggcca gccagcctca 60

attagctgca agtcctctca aagtctggag aaccccaatg ggaacactta ccttaattgg 120

tatctgcaga aacccggaca atcccctcaa ctcctgatct acagggtctc taagagattc 180

tcaggcgtgc cagatcgctt tagcggttcc gggtctggca cagacttcac cttgaagatt 240

agtcgggttg aagctgagga tgtgggagtc tattactgtc tgcagctcac tcatgtgccc 300

tacacctttg gtcagggcac aaaactggag atcaagcgga ccgtggccgc tccctccgtg 360

ttcatcttcc caccctccga cgagcagctg aagtccggca ccgccagcgt ggtgtgcctg 420

ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480

tccggcaact cccaggaatc cgtgaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg 540

tcctccaccc tgaccctgtc caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgaa 600

gtgacccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagtcct tcaaccgggg cgagtgc 657

<210> 205
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 205

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 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

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> 206
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 206

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 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> 207
<211> 2514
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 207

caggtccagc tggtgcagtc cggcgccgag gtcaagaaac ccggggcttc tgtgaaggtt 60

tcatgcaagg caagcggata caccttcacc gactatatca tgcattgggt caggcaggcc 120

cctggccaag gtctcgaatg gatgggctac attaacccat ataatgatgg ctccaaatac 180

accgagaagt ttcagggaag agtcactatg acatctgaca ccagtatcag cactgcttac 240

atggagctgt cccgccttcg gtctgatgac accgcagtgt attactgtgc caggggcaca 300

tattactacg gctcagctct gttcgactat tgggggcagg gaaccacagt aaccgtgagc 360

tccgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 1980

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 2040

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 2100

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 2160

aaagctgggg tgtactatgt gttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 2220

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 2280

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 2340

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 2400

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc aggggggcaac tgtgctggga 2460

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaa 2514

<210> 208
<211> 1932
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ligando monomérico botón de Fc anti-CD19(8B8-018) ADN

<400> 208
caggtccagc tggtgcagtc cggcgccgag gtcaagaaac ccggggcttc tgtgaaggtt 60

tcatgcaagg caagcggata caccttcacc gactatatca tgcattgggt caggcaggcc 120

cctggccaag gtctcgaatg gatgggctac attaacccat ataatgatgg ctccaaatac 180

accgagaagt ttcagggaag agtcactatg acatctgaca ccagtatcag cactgcttac 240

atggagctgt cccgccttcg gtctgatgac accgcagtgt attactgtgc caggggcaca 300

tattactacg gctcagctct gttcgactat tgggggcagg gaaccacagt aaccgtgagc 360

tccgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccccct 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aa 1932

<210> 209
<211> 838
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 209

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 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

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 Gly Ser Gly 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 Gly Gly Ser Gly 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

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> 210
<211> 644
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ligando monomérico botón de Fc anti-CD19(8B8-018)

<400> 210

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 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

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 Gly Ser Gly 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> 211
<211> 2478
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ligando dimérico (71-248) ojal de Fc anti-CD19(8B8-018) ADN

<400> 211
caggtccagc tggtgcagtc cggcgccgag gtcaagaaac ccggggcttc tgtgaaggtt 60

tcatgcaagg caagcggata caccttcacc gactatatca tgcattgggt caggcaggcc 120

cctggccaag gtctcgaatg gatgggctac attaacccat ataatgatgg ctccaaatac 180

accgagaagt ttcagggaag agtcactatg acatctgaca ccagtatcag cactgcttac 240

atggagctgt cccgccttcg gtctgatgac accgcagtgt attactgtgc caggggcaca 300

tattactacg gctcagctct gttcgactat tgggggcagg gaaccacagt aaccgtgagc 360

tccgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccctgatgat cctgccggac tgctggacct gcggcaggga 1440

atgtttgccc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagcagg cctgggaggc 1920

ggcggatctg gcggcggagg atctagagaa ggacccgagc tgtcccccga cgatcccgct 1980

gggctgctgg atctgagaca gggcatgttc gctcagctgg tggctcagaa tgtgctgctg 2040

attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggctgg caggggtgtc cctgactggg 2100

ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctggtggtgg ctaaagctgg ggtgtactat 2160

gtgttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 2220

ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gcagcagggg ctgcagcact ggccctgact 2280

gtggacctgc ccccagcttc ttccgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 2340

ctgctgcatc tgagcgccgg acagcgcctg ggagtgcatc tgcatactga agccagagcc 2400

cggcatgctt ggcagctgac tcaggggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 2460

gagatcccag ccgggctc 2478

<210> 212
<211> 1914
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ligando monomérico (71-248) botón de Fc anti-CD19(8B8-018) ADN

<400> 212
caggtccagc tggtgcagtc cggcgccgag gtcaagaaac ccggggcttc tgtgaaggtt 60

tcatgcaagg caagcggata caccttcacc gactatatca tgcattgggt caggcaggcc 120

cctggccaag gtctcgaatg gatgggctac attaacccat ataatgatgg ctccaaatac 180

accgagaagt ttcagggaag agtcactatg acatctgaca ccagtatcag cactgcttac 240

atggagctgt cccgccttcg gtctgatgac accgcagtgt attactgtgc caggggcaca 300

tattactacg gctcagctct gttcgactat tgggggcagg gaaccacagt aaccgtgagc 360

tccgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccccct 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccctgatgat cctgccggac tgctggacct gcggcaggga 1440

atgtttgccc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg gctc 1914

<210> 213
<211> 826
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ligando dimérico (71-248) ojal de Fc anti-CD19(8B8-018)

<400> 213

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 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

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 Gly Ser Gly 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 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> 214
<211> 638
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ligando monomérico (71-248) botón de Fc anti-CD19(8B8-018)

<400> 214

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 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

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 Gly Ser Gly 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> 215
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos, CD19 (8B8) VH clon original ADN

<400> 215
gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

gcctgcaagg cttctggata cacattcact gactatatta tgcactgggt gaagcagaag 120

actgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ttctaagtac 180

actgagaagt tcaacggcaa ggccacactg acttcagaca aatcttccat cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagggacc 300

tattattatg gtagcgccct ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360

tcg 363

<210> 216
<211> 336

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos, CD19 (8B8) VL clon original ADN

<400> 216
gatgctgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca ggtctagtca gagccttgaa aacagtaatg gaaacaccta tttgaactgg 120

tacctccaga aaccaggcca gtctccacaa ctcctgatct acagggtttc caaacgattt 180

tctggggtcc tagacaggtt cagtggtagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tatttctgcc tacaacttac acatgtcccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 217
<211> 94
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 43-45: 40 % Y, 6 % A/S/T/G/P/D/N/E/Q/V, 49-51: 40 % N, 6 % A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 55-57: 25 % S/T/Q/E, 61-63: 25 % S/T/Q/E

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(63)
<223> n es a, c, g o t

<400> 217
cagctgcggg ctctgacccg gtttctggag ataccagttc agnnncgtnn ngccnnngga 60

nnnttccaga gattggctgg atttgcaaga aatg 94

<210> 218
<211> 99
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 40-42: 30 % R, 20 % E, 5 % A/S/T/Y/G/P/D/N/Q/V. 49-51: 30 % K, 20 % S, 5 % A/N/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 55-57: 40 % F, 5 % A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V/I/L, 58-60: 40 % S, 6,6 % A/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 67-69: 50 % P, 50 % L

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(60)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (67)..(69)
<223> n es a, c, g o t

<400> 218
ctccagaaac cgggtcagag cccgcagctg ctgatctacn nngtatctnn ncgcnnnnnn 60

ggcgttnnng atcgtttcag cggttctgga tccggcacc 99

<210> 219
<211> 99
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 40-42: 52 % H, 4 % G/A/S/P/T/N/Y/D/E/Q/V/I, 46-48: 30 % I, 15 % Y, 5 % G/A/S/T/P/N/H/D/E/Q/V, 49-51: 52 % Y, 4 % G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 52-54: 30 % D, 15 % G, 5 % A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 55-57: 52 % T, 4 % G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 61-63: 52 % T, 4 % G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(63)
<223> n es a, c, g o t

<400> 219
catccactcc agaccctggc ccggggcctg acgaacccan nncatnnnnn nnnnnnngaa 60

nnngtaacca gatgctttgc agctcacttt aacggaagc 99

<210> 220
<211> 99
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 34-36: 45 % Y, 5 % otros, 40-42: 52 % N, 4 % otros, 46-48: 40 % Y, 5 % otros, 49-51: 30 % N, 15 % S, 5 % otros, 52-54: 30 % D, 15 % G, 5 % otros, 55-57: 52 % G, 4 % otros, 61-63: 30 % K, 15 % N, 4 % others, 70-72: 30% E, 15% Q, 5% others

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(63)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (70)..(72)
<223> n es a, c, g o t

<400> 220
caggccccgg gccagggtct ggagtggatg ggcnnnattn nnccannnnn nnnnnnntcc 60

nnntataccn nnaaattcca gggccgcgtc acgatgacc 99

<210> 221
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constante inversa H3 CD19

<400> 221
cgtcaccggt tcggggaagt agtccttgac cag 33

<210> 222
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LMB3

<400> 222
caggaaacag ctatgaccat gattac 26

<210> 223
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constante directa L1 CD19

<400> 223
tggtatctcc agaaaccggg tcagagcccg cag 33

<210> 224
<211> 84
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 34-36: 52 % Y, 4 % otros, 37-39: 52 % P, 4 % otros, 40-42: 42 % V, 10 % L, 4 % otros, 43-45: 52 % H, 4 % otros, 46-48: 42 % T, 10 % I, 4 % otros, 49-51: 45 % L, 11 % G, 4 % otros

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature

<222> (43)..(45)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> n es a, c, g o t

<400> 224
tttaatttcc agtttagttc cttgaccgaa ggtnnnnnnn nnnnnnnnnn nctgcagaca 60

atagtagacg ccaacgtctt cagc 84

<210> 225
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constante directa L3 CD19

<400> 225
accttcggtc aaggaactaa actggaaatt aaacg 35

<210> 226
<211> 107
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pos. 59-61: 50 % L, 3.8 % otros, 62-64: 50 % A, 4.2 % otros, 65-67: 50 % S, 4.2 % otros, 68-70: 50 % G, 4.2 % otros, 71-73: 50 % Y, 4.2 % others, 74-76: 50% Y, 4.2% others, 77-79: 50% Y, 4.2% others, 80-82: 50 % T, 4.2 % otros, 83-85: 50 % G, 4.2 % otros.

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(58)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(61)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (62)..(64)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (65)..(67)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (68)..(70)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (71)..(73)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(76)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (77)..(79)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (80)..(82)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (83)..(85)
<223> n es a, c, g o t

<400> 226
ttggtgctag cagagcttac ggtcaccgtg gtaccttggc cccagtaatc aaannnnnnn 60

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gcgtgcacaa tagtaaacag cggtgtc 107

<210> 227
<211> 1615
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> marca SNAP ECD CD19 hu - PDGFR ADN

<400> 227
ggccgccgct agcggcatcg actacaagga cgacgatgac aaggccggca tcgatgccat 60

catggacaaa gactgcgaaa tgaagcgcac caccctggat agccctctgg gcaagctgga 120

actgtctggg tgcgaacagg gcctgcacga gatcaagctg ctgggcaaag gaacatctgc 180

cgccgacgcc gtggaagtgc ctgccccagc cgccgtgctg ggcggaccag agccactgat 240

gcaggccacc gcctggctca acgcctactt tcaccagcct gaggccatcg aggagttccc 300

tgtgccagcc ctgcaccacc cagtgttcca gcaggagagc tttacccgcc aggtgctgtg 360

gaaactgctg aaagtggtga agttcggaga ggtcatcagc taccagcagc tggccgccct 420

ggccggcaat cccgccgcca ccgccgccgt gaaaaccgcc ctgagcggaa atcccgtgcc 480

cattctgatc ccctgccacc gggtggtgtc tagctctggc gccgtggggg gctacgaggg 540

cgggctcgcc gtgaaagagt ggctgctggc ccacgagggc cacagactgg gcaagcctgg 600

gctgggtgat atccccgagg aacccctggt cgtgaaggtg gaagagggcg acaatgccgt 660

gctgcagtgc ctgaagggca cctccgatgg ccctacccag cagctgacct ggtccagaga 720

gagccccctg aagcccttcc tgaagctgtc tctgggcctg cctggcctgg gcatccatat 780

gaggcctctg gccatctggc tgttcatctt caacgtgtcc cagcagatgg gcggcttcta 840

cctgtgtcag cctggccccc catctgagaa ggcttggcag cctggctgga ccgtgaacgt 900

ggaaggatcc ggcgagctgt tccggtggaa cgtgtccgat ctgggcggcc tgggatgcgg 960

cctgaagaac agatctagcg agggccccag cagccccagc ggcaaactga tgagccccaa 1020

gctgtacgtg tgggccaagg acagacccga gatctgggag ggcgagcctc cttgcctgcc 1080

ccctagagac agcctgaacc agagcctgag ccaggacctg acaatggccc ctggcagcac 1140

actgtggctg agctgtggcg tgccacccga ctctgtgtct agaggccctc tgagctggac 1200

ccacgtgcac cctaagggcc ctaagagcct gctgagcctg gaactgaagg acgacaggcc 1260

cgccagagat atgtgggtca tggaaaccgg cctgctgctg cctagagcca cagcccagga 1320

tgccggcaag tactactgcc acagaggcaa cctgaccatg agcttccacc tggaaatcac 1380

cgccagaccc gtgctgtggc actggctgct gagaacaggc ggctggaagg tcgacgaaca 1440

aaaactcatc tcagaagagg atctgaatgc tgtgggccag gacacgcagg aggtcatcgt 1500

ggtgccacac tccttgccct ttaaggtggt ggtgatctca gccatcctgg ccctggtggt 1560

gctcaccatc atctccctta tcatcctcat catgctttgg cagaagaagc cacgt 1615

<210> 228
<211> 1620
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> marca SNAP ECD CD19 cy - PDGFR ADN

<400> 228
ccggccgccg ctagcggcat cgactacaag gacgacgatg acaaggccgg catcgatgcc 60

atcatggaca aagactgcga aatgaagcgc accaccctgg atagccctct gggcaagctg 120

gaactgtctg ggtgcgaaca gggcctgcac gagatcaagc tgctgggcaa aggaacatct 180

gccgccgacg ccgtggaagt gcctgcccca gccgccgtgc tgggcggacc agagccactg 240

atgcaggcca ccgcctggct caacgcctac tttcaccagc ctgaggccat cgaggagttc 300

cctgtgccag ccctgcacca cccagtgttc cagcaggaga gctttacccg ccaggtgctg 360

tggaaactgc tgaaagtggt gaagttcgga gaggtcatca gctaccagca gctggccgcc 420

ctggccggca atcccgccgc caccgccgcc gtgaaaaccg ccctgagcgg aaatcccgtg 480

cccattctga tcccctgcca ccgggtggtg tctagctctg gcgccgtggg gggctacgag 540

ggcgggctcg ccgtgaaaga gtggctgctg gcccacgagg gccacagact gggcaagcct 600

gggctgggtg atatccccca ggaacccctg gtcgtgaagg tggaagaggg cgacaatgcc 660

gtgctccagt gtctcgaggg cacctccgat ggccctacac agcagctcgt gtggtgcaga 720

gacagcccct tcgagccctt cctgaacctg tctctgggcc tgcctggcat gggcatcaga 780

atgggccctc tgggcatctg gctgctgatc ttcaacgtgt ccaaccagac cggcggcttc 840

tacctgtgtc agcctggcct gccaagcgag aaggcttggc agcctggatg gaccgtgtcc 900

gtggaaggat ctggcgagct gttccggtgg aacgtgtccg atctgggcgg cctgggatgc 960

ggcctgaaga acagaagcag cgagggccct agcagcccca gcggcaagct gaatagcagc 1020

cagctgtacg tgtgggccaa ggacagaccc gagatgtggg agggcgagcc tgtgtgtggc 1080

ccccctagag atagcctgaa ccagagcctg agccaggacc tgacaatggc ccctggcagc 1140

acactgtggc tgagctgtgg cgtgccaccc gactctgtgt ccagaggccc tctgagctgg 1200

acacacgtgc ggcctaaggg ccctaagagc agcctgctga gcctggaact gaaggacgac 1260

cggcccgacc gggatatgtg ggtggtggat acaggcctgc tgctgaccag agccacagcc 1320

caggatgccg gcaagtacta ctgccacaga ggcaactgga ccaagagctt ttacctggaa 1380

atcaccgcca gacccgccct gtggcactgg ctgctgagaa tcggaggctg gaaggtcgac 1440

gagcagaagc tgatctccga agaggacctg aacgccgtgg gccaggatac ccaggaagtg 1500

atcgtggtgc cccacagcct gcccttcaag gtggtcgtga tcagcgccat tctggccctg 1560

gtggtgctga ccatcatcag cctgatcatc ctgattatgc tgtggcagaa aaagccccgc 1620

<210> 229
<211> 539
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> marca SNAP ECD CD19 hu- PDGFR

<400> 229

Pro Ala Ala Ala Ser Gly Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala
1 5 10 15

Gly Ile Asp Ala Ile Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr
20 25 30

Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly
35 40 45

Leu His Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala
50 55 60

Val Glu Val Pro Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu
65 70 75 80

Met Gln Ala Thr Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala
85 90 95

Ile Glu Glu Phe Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln
100 105 110

Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys
115 120 125

```
Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn
130                 135                 140

Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val
145                 150                 155                 160

Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val
                165                 170                 175

Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His
180                 185                 190

Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Asp Ile Pro Glu Glu
        195                 200                 205

Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val Leu Gln Cys
    210                 215                 220

Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr Trp Ser Arg
225                 230                 235                 240

Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly Leu Pro Gly
                245                 250                 255

Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe Ile Phe Asn
            260                 265                 270

Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro Gly Pro Pro
        275                 280                 285

Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val Glu Gly Ser
    290                 295                 300

Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly Leu Gly Cys
305                 310                 315                 320

Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Ser Gly Lys
                325                 330                 335

Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg Pro Glu Ile
            340                 345                 350

Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser Leu Asn Gln
        355                 360                 365

Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr Leu Trp Leu
370                 375                 380

Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro Leu Ser Trp
385                 390                 395                 400
```

Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser Leu Glu Leu
405 410 415

Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu Thr Gly Leu
420 425 430

Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr Tyr Cys His
435 440 445

Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr Ala Arg Pro
450 455 460

Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys Val Asp Glu
465 470 475 480

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ala Val Gly Gln Asp Thr
485 490 495

Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu Pro Phe Lys Val Val Val
500 505 510

Ile Ser Ala Ile Leu Ala Leu Val Val Leu Thr Ile Ile Ser Leu Ile
515 520 525

Ile Leu Ile Met Leu Trp Gln Lys Lys Pro Arg
530 535

<210> 230
<211> 540
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> marca SNAP ECD CD19 cy- PDGFR

<400> 230

Pro Ala Ala Ala Ser Gly Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala
1 5 10 15

Gly Ile Asp Ala Ile Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr
20 25 30

Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly
35 40 45

Leu His Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala
50 55 60

Val Glu Val Pro Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu
65 70 75 80

```
Met Gln Ala Thr Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala
                85                  90                  95

Ile Glu Glu Phe Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln
100                 105                 110

Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys
115                 120                 125

Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn
130                 135                 140

Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val
145                 150                 155                 160

Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val
                165                 170                 175

Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His
180                 185                 190

Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Asp Ile Pro Gln Glu
        195                 200                 205

Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val Leu Gln Cys
    210                 215                 220

Leu Glu Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Val Trp Cys Arg
225                 230                 235                 240

Asp Ser Pro Phe Glu Pro Phe Leu Asn Leu Ser Leu Gly Leu Pro Gly
                245                 250                 255

Met Gly Ile Arg Met Gly Pro Leu Gly Ile Trp Leu Leu Ile Phe Asn
            260                 265                 270

Val Ser Asn Gln Thr Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro Gly Leu Pro
275                 280                 285

Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Ser Val Glu Gly Ser
    290                 295                 300

Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly Leu Gly Cys
305                 310                 315                 320

Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Ser Gly Lys
                325                 330                 335

Leu Asn Ser Ser Gln Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg Pro Glu Met
            340                 345                 350
```

Trp Glu Gly Glu Pro Val Cys Gly Pro Pro Arg Asp Ser Leu Asn Gln
355 360 365

Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr Leu Trp Leu
370 375 380

Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro Leu Ser Trp
385 390 395 400

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

Leu Lys Asp Asp Arg Pro Asp Arg Asp Met Trp Val Val Asp Thr Gly
420 425 430

Leu Leu Leu Thr Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr Tyr Cys
435 440 445

His Arg Gly Asn Trp Thr Lys Ser Phe Tyr Leu Glu Ile Thr Ala Arg
450 455 460

Pro Ala Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Ile Gly Gly Trp Lys Val Asp
465 470 475 480

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ala Val Gly Gln Asp
485 490 495

Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu Pro Phe Lys Val Val
500 505 510

Val Ile Ser Ala Ile Leu Ala Leu Val Val Leu Thr Ile Ile Ser Leu
515 520 525

Ile Ile Leu Ile Met Leu Trp Gln Lys Lys Pro Arg
530 535 540

<210> 231
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L1 CD19 (8B8-5H09)

<400> 231

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

<210> 232
<211> 7
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L2 CD19(8B8-5H09)

<400> 232

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 233
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L3 CD19(8B8-5H09)

<400> 233

Leu Gln Leu Ile Asp Tyr Pro Val Thr
1 5

<210> 234
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H1 CD19(8B8-5H09)

<400> 234

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 235
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H2 CD19(8B8-5H09)

<400> 235

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

Gly

<210> 236
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H3 CDR(8B8-5H09)

<400> 236

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

<210> 237
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L1 CD19(8B8-7H07)

<400> 237

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

<210> 238
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L2 CD19 (8B8-7H07)

<400> 238

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 239
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L3 CD19 (8B8-7H07)

<400> 239

Leu Gln Ala Thr His Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 240
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H1 CD19 (8B8-7H07)

<400> 240

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 241
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H2 CD19 (8B8-7H07)

<400> 241

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

Gly

<210> 242
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H3 CD19 (8B8-7H07)

<400> 242

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

<210> 243
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L1 CD19 (8B8-2B03)

<400> 243

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

<210> 244
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L2 CD19 (8B8-2B03)

<400> 244

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 245
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L3 CD19 (8B8-2B03)

<400> 245

Leu Gln Leu Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 246
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H1 CD19 (8B8-2B03)

<400> 246

Asp Tyr Ile Thr His
1 5

<210> 247
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H2 CD19 (8B8-2B03)

<400> 247

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

Gly

<210> 248
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H3 CD19 (8B8-2B03)

<400> 248

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

<210> 249
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 249

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

<210> 250
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L2 CD19 (8B8-2B11)

<400> 250

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 251
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 251

Leu Gln Leu Leu Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 252
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 252

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 253
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 253

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

Gly

<210> 254
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 254

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

<210> 255
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L1 CD19 (8B8-5A07)

<400> 255

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

<210> 256
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L2 CD19 (8B8-5A07)

<400> 256

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 257
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L3 CD19 (8B8-5A07)

<400> 257

Leu Gln Pro Gly His Tyr Pro Gly Thr
1 5

<210> 258
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H1 CD19 (8B8-5A07)

<400> 258

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 259
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H2 CD19 (8B8-5A07)

<400> 259

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 260
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H3 CD19 (8B8-5A07)

<400> 260

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

<210> 261
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L1 CD19 (8B8-5B08)

<400> 261

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

<210> 262
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L2 CD19 (8B8-5B08)

<400> 262

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 263
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L3 CD19 (8B8-5B08)

<400> 263

Leu Gln Leu Asp Ser Tyr Pro Asn Thr
1 5

<210> 264
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H1 CD19 (8B8-5B08)

<400> 264

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 265
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H2 CD19 (8B8-5B08)

<400> 265

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

Gly

<210> 266
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H3 CD19 (8B8-5B08)

<400> 266

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

<210> 267
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L1 CD19 (8B8-5D08)

<400> 267

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

<210> 268
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L2 CD19 (8B8-5D08)

<400> 268

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser

1 5

<210> 269
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L3 CD19 (8B8-5D08)

<400> 269

Leu Gln Leu Thr His Glu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 270
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H1 CD19 (8B8-5D08)

<400> 270

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 271
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H2 CD19 (8B8-5D08)

<400> 271

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

Gly

<210> 272
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H3 CD19 (8B8-5D08)

<400> 272

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

<210> 273
<211> 657
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera original CD19 (8B8) ADN

<400> 273
gatgctgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca ggtctagtca gagccttgaa aacagtaatg gaaacaccta tttgaactgg 120

tacctccaga aaccaggcca gtctccacaa ctcctgatct acagggtttc caaacgattt 180

tctggggtcc tagacaggtt cagtggtagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tatttctgcc tacaacttac acatgtcccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 274
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada original CD19 (8B8) ADN

<400> 274
gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

gcctgcaagg cttctggata cacattcact gactatatta tgcactgggt gaagcagaag 120

actgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ttctaagtac 180

actgagaagt tcaacggcaa ggccacactg acttcagaca aatcttccat cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagggacc 300

tattattatg gtagcgccct ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360

tcggctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 275
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera original CD19 (8B8)

<400> 275

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
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 Leu
50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly 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> 276
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada original CD19 (8B8)

<400> 276

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

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

Ile Met His Trp Val Lys Gln Lys Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Asn Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Thr Leu 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

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

Leu Thr 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 Lys
450

<210> 277
<211> 657
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19 (8B8-2B11) ADN

<400> 277
gatattgtca tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaccacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagctgct ggaagatcca 300

tacaccttcg gtcaaggaac gaaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 278
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19 (8B8-2B11) ADN

<400> 278
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 279
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 279

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

```
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> 280
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 280

```
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 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

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

Leu Thr 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 Lys
450

<210> 281
<211> 657
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19 (8B8-7H07)

<400> 281
gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcaggcaac ccatatccca 300

tacaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 282
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19 (8B8-7H07) ADN

<400> 282
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gttctgaact gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 283
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19 (8B8-7H07)

<400> 283

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 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 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 Ala
85                  90                  95

Thr His Ile 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> 284
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19 (8B8-7H07)

<400> 284

```
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 Ser Glu 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

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

Leu Thr 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 Lys
450

<210> 285
<211> 657
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19 (8B8-2B03) ADN

<220>
<221> misc_feature
<222> (320)..(321)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 285
gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagttgac ccacgttccg 300

tacaccttcg gtcaaggaan naaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 286
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19 (8B8-2B03) ADN

<400> 286
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca cgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccagatct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 287
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19 (8B8-2B03)

<220>
<221> misc_feature
<222> (107)..(107)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 287

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 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 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 Xaa 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> 288
<211> 451
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19 (8B8-2B03)

<400> 288

```
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 Thr 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 Asp 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

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

Leu Thr 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 Lys
450

<210> 289
<211> 657
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19 (8B8-5A07)

<400> 289
gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagccagg tcattaccca 300

ggtaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 290
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19 (8B8-5A07) ADN

<400> 290
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtact 300

tactactacg gttccgccct ctttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 291
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19 (8B8-5A07)

<400> 291

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 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 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 Pro
85 90 95

Gly His Tyr Pro Gly 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> 292
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19 (8B8-5A07)

<400> 292

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 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

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

Leu Thr 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 Lys
450
```

<210> 293
<211> 657
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19 (8B8-5D08) ADN

<400> 293
gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagctgac ccatgaacca 300

tacaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 294
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19 (8B8-5D08) ADN

<400> 294
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gttctgaact gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 295
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19 (8B8-5D08)

<400> 295

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 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 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 Glu 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> 296
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19 (8B8-5D08)

<400> 296

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 Ser Glu 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

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

Leu Thr 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 Lys
450

<210> 297
<211> 657
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19 (8B8-5B08)

<400> 297
gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagctgga ttcttaccca 300

aacaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 298
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19 (8B8-5B08) ADN

<400> 298
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

ggggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 299
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19 (8B8-5B08)

<400> 299

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 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 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

Asp Ser Tyr Pro Asn 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> 300
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19 (8B8-5B08)

<400> 300

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 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

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

Leu Thr 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 Lys
450

<210> 301
<211> 657
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19 (8B8-5H09) ADN

<400> 301
gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa tcttccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagctgat cgattaccca 300

gttaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 302
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19 (8B8-5H09) ADN

<400> 302
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gttctgcact gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 303
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CD19 (8B8-5H09)

<400> 303

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 Ser Ser
20 25 30

Thr 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 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

Ile Asp Tyr Pro Val 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> 304
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19 (8B8-5H09)

<400> 304

```
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 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
```

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

Leu Thr 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 Lys
450

<210> 305
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc CD19(8B8-2B11) ADN

<400> 305
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 306
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 306

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 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

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> 307
<211> 2514
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ligando dimérico ojal de Fc CD19(8B8-2B11) ADN

<400> 307
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 1980

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 2040

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 2100

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 2160

aaagctgggg tgtactatgt gttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 2220

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 2280

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 2340

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 2400

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 2460

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaa 2514

<210> 308
<211> 1932
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ligando monomérico botón de Fc CD19(8B8-2B11)ADN

<400> 308
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

ggggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccccct 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aa 1932

<210> 309
<211> 838
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ligando dimérico ojal de Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 309

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 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

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 Gly Ser Gly 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 Gly Gly Ser Gly 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

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> 310
<211> 644
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ligando monomérico botón de Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 310

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 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

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 Gly Ser Gly 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> 311
<211> 2478
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ligando dimérico (71-248) ojal de Fc CD19(8B8-2B11) ADN

<400> 311
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccctgatgat cctgccggac tgctggacct gcggcaggga 1440

atgtttgccc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagcagg cctgggaggc 1920

ggcggatctg gcggcggagg atctagagaa ggacccgagc tgtcccccga cgatcccgct 1980

gggctgctgg atctgagaca gggcatgttc gctcagctgg tggctcagaa tgtgctgctg 2040

attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggctgg caggggtgtc cctgactggg 2100

ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctggtggtgg ctaaagctgg ggtgtactat 2160

gtgttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 2220

ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gcagcagggg ctgcagcact ggccctgact 2280

gtggacctgc ccccagcttc ttccgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 2340

ctgctgcatc tgagcgccgg acagcgcctg ggagtgcatc tgcatactga agccagagcc 2400

cggcatgctt ggcagctgac tcaggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 2460

gagatcccag ccgggctc 2478

<210> 312
<211> 1914
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ligando monomérico (71-248) botón de Fc CD19(8B8-2B11) ADN

<400> 312
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccct 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccctgatgat cctgccggac tgctggacct gcggcaggga 1440

atgtttgccc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg gctc 1914

<210> 313
<211> 826
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ligando dimérico (71-248) ojal de Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 313

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 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

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 Gly Ser Gly 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 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> 314
<211> 638
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ligando monomérico (71-248) botón de Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 314

```
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 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

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 Gly Ser Gly 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> 315
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19(8B8-018) (PGLALA huIgG1) ADN

<400> 315
caggtccagc tggtgcagtc cggcgccgag gtcaagaaac ccggggcttc tgtgaaggtt 60

tcatgcaagg caagcggata caccttcacc gactatatca tgcattgggt caggcaggcc 120

cctggccaag gtctcgaatg gatgggctac attaacccat ataatgatgg ctccaaatac 180

accgagaagt ttcagggaag agtcactatg acatctgaca ccagtatcag cactgcttac 240

atggagctgt cccgccttcg gtctgatgac accgcagtgt attactgtgc caggggcaca 300

tattactacg gctcagctct gttcgactat tgggggcagg gaaccacagt aaccgtgagc 360

tccgcaagta ctaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agcagctggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggag cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtccccgggc aaa 1353

<210> 316
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada CD19(8B8-018) (PGLALA huIgG1)

<400> 316

```
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 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

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

Leu Thr 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 Lys
    450
```

<210> 317
<211> 140
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH T84.66 anti-CEA mu

<400> 317

```
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
1               5                   10                  15

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Glu
            20                  25                  30
```

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35 40 45

Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val
65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 318
<211> 131
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL T84.66 anti-CEA mu

<400> 318

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser
35 40 45

Val Asp Ile Phe Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Ile Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

115 120 125

Glu Ile Lys
130

<210> 319
<211> 392
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia aceptora estructural cadena pesada

<400> 319
taaggggctt cctagtccta aggctgagga agggatcctg gtttagttaa agaggatttt 60

attcacccct gtgtcctctc cacaggtgtc cagtcccagg tccagctggt gcaatctggg 120

gctgaggtga agaagcctgg gtcctcggtg aaggtctcct gcaaggcttc tggaggcacc 180

ttcagcagct atactatcag ctgggtgcga caggcccctg gacaagggct tgagtggatg 240

ggaaggatca tccctatcct tggtacagca aactacgcac agaagttcca gggcagagtc 300

acgattaccg cggacaaatc cacgagcaca gcctacatgg agctgagcag cctgagatct 360

gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcgaga ga 392

<210> 320
<211> 797
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia aceptora estructural cadena ligera

<400> 320
ctgcagctgg aagctcagct cccacccagc tgctttgcat gtcctccca gctgccctac 60

cttccagagc ccatatcaat gcctgtgtca gagccctggg gaggaactgc tcagttagga 120

cccagaggga accatggaag ccccagctca gcttctcttc ctcctgctac tctggctccc 180

aggtgagggg aacatgaggt ggttttgcac attagtgaaa actcttgcca cctctgctca 240

gcaagaaata taattaaaat tcaaagtata tcaacaattt tggctctact caaagacagt 300

tggtttgatc ttgattacat gagtgcattt ctgttttatt tccaatttca gataccaccg 360

gagaaattgt gttgacacag tctccagcca ccctgtcttt gtctccaggg gaaagagcca 420

ccctctcctg cagggccagt cagagtgtta gcagctactt agcctggtac caacagaaac 480

ctggccaggc tcccaggctc ctcatctatg atgcatccaa cagggccact ggcatcccag 540

ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc agcctagagc 600

ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc agcgtagcaa ctggcctccc acagtgattc 660

cacatgaaac aaaaacccca acaagaccat cagtgtttac tagattatta taccagctgc 720

ttcctttaca gacagctagt ggggtggcca ctcagtgtta gcatctcagc tctatttggc 780

cattttggag ttcaagt 797

<210> 321
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H1 CEA (T84.66-LCHA)

<400> 321

Asp Thr Tyr Met His
1 5

<210> 322
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H2 CEA(T84.66-LCHA)

<400> 322

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 323
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H3 CEA(T84.66-LCHA)

<400> 323

Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr
1 5 10

<210> 324
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L1 CEA(T84.66-LCHA)

<400> 324

Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe Gly Val Gly Phe Leu His
1 5 10 15

<210> 325
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L2 CEA(T84.66-LCHA)

<400> 325

Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 326
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR-L3 CEA(T84.66-LCHA)

<400> 326

Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 327
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de proteína fijadora de CEA original

<400> 327

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 328
<211> 111

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL de proteína fijadora de CEA original

<400> 328

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

Gln Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
85 90 95

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

<210> 329
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH CEA(T84.66-LCHA)

<400> 329

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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
130 135 140

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

Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn
165 170 175

Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr
180 185 190

Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
195 200 205

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val
210 215 220

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

Ser Ser

<210> 330
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL CEA(T84.66-LCHA)

<400> 330

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 Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
85 90 95

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

<210> 331
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc CEA(T84.66-LCHA) ADN

<400> 331
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggacagg gactggaatg gatgggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacactcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 332
<211> 654
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CEA(T84.66-LCHA) ADN

<400> 332
gagatcgtgc tgacccagag ccctgccacc ctgtcactgt ctccaggcga gagagccacc 60

ctgagctgta gagccggcga gagcgtggac atcttcggcg tgggatttct gcactggtat 120

cagcagaagc ccggccaggc ccccagactg ctgatctaca gagccagcaa ccgggccaca 180

ggcatccccg ccagattttc tggctctggc agcggcaccg acttcaccct gacaatcagc 240

agcctggaac ccgaggactt cgccgtgtac tactgccagc agaccaacga ggacccctac 300

acctttggcc agggcaccaa gctggaaatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360

atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540

agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 333
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc CEA (T84.66-LCHA)

<400> 333

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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu 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

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> 334
<211> 218
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CEA (T84.66-LCHA)

<400> 334

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 Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 335
<211> 2514
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de 4-1BBL dimérico (71-254) CEA(T84.66-LCHA) ADN

<400> 335
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggacagg gactggaatg gatgggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacactcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 1980

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 2040

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 2100

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 2160

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 2220

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 2280

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 2340

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 2400

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 2460

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaa 2514

<210> 336
<211> 1932
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 41-BBL monomérico (71-254) botón de Fc CEA(T84.66-LCHA) ADN

<400> 336
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggacagg gactggaatg gatgggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacactcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccccct 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aa 1932

<210> 337
<211> 838
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de 41-BBL dimérico (71-254) ojal de Fc CEA(T84.66-LCHA)

<400> 337

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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu 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

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 Gly Ser Gly 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 Gly Gly Ser Gly 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

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> 338
<211> 644
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de 4-1BBL monomérico (71-254) botón de Fc CEA(T84.66-LCHA)

<400> 338

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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu 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

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 Gly Ser Gly 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> 339
<211> 2478
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de 4-1BBL dimérico (71-248) ojal de Fc CEA (T84.66-LCHA) ADN

<400> 339
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggacagg gactggaatg gatgggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacactcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccctgatgat cctgccggac tgctggacct gcggcaggga 1440

atgtttgccc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagcagg cctgggaggc 1920

ggcggatctg gcggcggagg atctagagaa ggacccgagc tgtcccccga cgatcccgct 1980

gggctgctgg atctgagaca gggcatgttc gctcagctgg tggctcagaa tgtgctgctg 2040

attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggctgg caggggtgtc cctgactggg 2100

ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctggtggtgg ctaaagctgg ggtgtactat 2160

gtgttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 2220

ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gcagcagggg ctgcagcact ggccctgact 2280

gtggacctgc ccccagcttc ttccgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 2340

ctgctgcatc tgagcgccgg acagcgcctg ggagtgcatc tgcatactga agccagagcc 2400

cggcatgctt ggcagctgac tcaggggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 2460

gagatcccag ccgggctc 2478

<210> 340
<211> 1914
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de 4-1BBL monomérico (71-248) botón de Fc CEA (T84.66-LCHA) ADN

<400> 340
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggacagg gactggaatg gatgggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacactcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccct 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccctgatgat cctgccggac tgctggacct gcggcaggga 1440

atgtttgccc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg gctc 1914

<210> 341
<211> 826
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de 4-1BBL dimérico (71-248) ojal de Fc CEA (T84.66-LCHA)

<400> 341

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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu 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

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 Gly Ser Gly 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 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> 342
<211> 638
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de 4-1BBL monomérico (71-248) botón de Fc CEA (T84.66-LCHA)

<400> 342

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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu 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

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 Gly Ser Gly 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> 343
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc CEA(T84.66) ADN

<400> 343
gaggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgaa ctggtggaac ctggcgcctc tgtgaagctg 60

agctgtaccg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt caagcagcgg 120

cctgagcagg gcctggaatg gatcggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcaa ggccaccatc accgccgaca ccagcagcaa cacagcctac 240

ctgcagctga ccagcctgac ctccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacaagcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 344
<211> 654

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera anti- CEA(T84.66) ADN

<400> 344
gacatcgtgc tgacccagag ccctgcctct ctggccgtgt ctctgggaca gagggccacc 60

atgtcttgca gagccggcga gagcgtggac atcttcggcg tgggatttct gcactggtat 120

cagcagaagc ccggccagcc ccccaagctg ctgatctaca gagccagcaa cctggaaagc 180

ggcatccccg tgcggtttag cggcaccggc agcagaaccg acttcaccct gatcatcgac 240

cccgtggaag ccgacgacgt ggccacctac tactgccagc agaccaacga ggacccctac 300

acctttggcg gaggcaccaa gctggaaatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360

atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540

agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 345
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de ojal de Fc CEA (T84.66)

<400> 345

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

```
Gln Gly Thr Ser 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

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> 346
<211> 218
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera CEA (T84.66)

<400> 346

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

Gln Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
            20                  25                  30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35                  40                  45

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

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 347
<211> 2514
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de 4-1BBL dimérico (71-254) ojal de Fc CEA(T84.66) ADN

<400> 347
gaggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgaa ctggtggaac ctggcgcctc tgtgaagctg 60

agctgtaccg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt caagcagcgg 120

cctgagcagg gcctggaatg gatcggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcaa ggccaccatc accgccgaca ccagcagcaa cacagcctac 240

ctgcagctga ccagcctgac ctccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacaagcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 1980

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 2040

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 2100

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 2160

aaagctgggg tgtactatgt gtttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 2220

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 2280

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 2340

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 2400

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 2460

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaa 2514

<210> 348
<211> 1932
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de 4-1BBL monomérico (72-254) botón de Fc CEA(T84.66) ADN

<400> 348
gaggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgaa ctggtggaac ctggcgcctc tgtgaagctg 60

agctgtaccg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt caagcagcgg 120

cctgagcagg gcctggaatg gatcggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcaa ggccaccatc accgccgaca ccagcagcaa cacagcctac 240

ctgcagctga ccagcctgac ctccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacaagcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

ggggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccccct 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aa 1932

<210> 349
<211> 838
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de 4-1BBL dimérico (71-254) ojal de Fc CEA(T84.66)

<400> 349

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
            20                  25                  30

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100                 105                 110

Gln Gly Thr Ser 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

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 Gly Ser Gly 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 Gly Gly Ser Gly 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

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> 350
<211> 644
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena de 4-1BBL monomérico (71-254) botón de Fc CEA(T84.66)

<400> 350

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser 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

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 Gly Ser Gly 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> 351
<211> 1287
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NA3B3A2 hu-avi His ADN

<400> 351
cagctgacca ccgagtccat gcccttcaac gtggccgagg gcaaagaggt gctgctgctg 60

gtccacaacc tgccccagca gctgttcggc tacagctggt acaagggcga gcgggtggac 120

ggcaaccggc agatcgtggg ctacgccatc ggcacccagc aggccacacc cggccctgcc 180

aatagcggca gagagacaat ctaccccaac gccagcctgc tgatccagaa cgtgacccag 240

aacgacaccg gcttctacac actccaagtc atcaagagcg acctggtcaa cgaggaagcc 300

accggccagt tccacgtgta ccccgagctg cccaagccca gcatcagcag caacaacagc 360

aagcccgtgg aagataagga cgccgtggcc tttacctgcg agcccgaggc ccagaacacc 420

acctacctgt ggtgggtcaa cggccagagc ctgcccgtgt cccccagact ccagctgagc 480

aacggcaaca gaaccctgac cctgttcaac gtgacccgga atgacgccag agcctacgtg 540

tgcggcatcc agaacagcgt gtccgccaac cgcagcgacc ccgtgaccct ggatgtgctg 600

tacggccccg acaccccccat catcagcccc cctgacagca gctacctgag cggcgccaac 660

ctgaacctga gctgccacag cgccagcaac cccagccctc agtacagctg gcggatcaac 720

ggcatccccc agcagcacac ccaggtgctg tttatcgcca agatcacccc caacaacaac 780

ggcacctacg cctgcttcgt gtccaacctg gccaccggcc ggaacaacag catcgtgaag 840

tccatcaccg tgtccgcctc cctgagcccc gtggtggcca agcctcagat caaggccagc 900

aagaccaccg tgaccggcga caaggacagc gtgaacctga cctgctccac caacgatacc 960

ggcatcagca tccggtggtt cttcaagaat cagtccctgc ccagcagcga gcggatgaag 1020

ctgagccagg gcaacatcac cctgtccatc aaccccgtga aaagagagga cgccggcacc 1080

tattggtgcg aggtgttcaa ccccatcagc aagaaccaga gcgaccccat catgctgaac 1140

gtgaactaca acgccctgcc ccaagaaaac ctgatcaatg ttgatctgga agtgctgttc 1200

cagggcccag gcagcggcct gaacgacatc ttcgaagccc agaaaatcga gtggcacgag 1260

gccagagccc accaccacca tcaccac 1287

<210> 352
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NA3B3A2 hu-avi-His

<400> 352

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

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr
35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg
50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
65 70 75 80

```
Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
                85                  90                  95

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

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
        115                 120                 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp
    130                 135                 140

Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145                 150                 155                 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala
                165                 170                 175

Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser
            180                 185                 190

Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Ile Ile
        195                 200                 205

Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser
    210                 215                 220

Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn
225                 230                 235                 240

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

Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr
            260                 265                 270

Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Ser Leu
        275                 280                 285

Ser Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val
    290                 295                 300

Thr Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr
305                 310                 315                 320

Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser
                325                 330                 335

Glu Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Ile Thr Leu Ser Ile Asn Pro
            340                 345                 350
```

Val Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro
355 360 365

Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn
370 375 380

Ala Leu Pro Gln Glu Asn Leu Ile Asn Val Asp Leu Glu Val Leu Phe
385 390 395 400

Gln Gly Pro Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile
405 410 415

Glu Trp His Glu Ala Arg Ala His His His His His His
420 425

<210> 353
<211> 1860
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> OX40L hu dimérico (51-183) - CL* cadena de botón de Fc ADN

<400> 353
caggtgtccc acagataccc cagaatccag agcatcaagg tgcagttcac cgagtacaag 60

aaagagaagg gcttcatcct gaccagccag aaagaggacg agatcatgaa ggtgcaggac 120

aacagcgtga tcatcaactg cgacggcttc tacctgatca gcctgaaggg ctacttcagc 180

caggaagtgg acatcagcct gcactaccag aaggacgagg aacccctgtt ccagctgaag 240

aaagtgcgga gcgtgaacag cctgatggtg gccagcctga cctacaagga caaggtgtac 300

ctgaacgtga ccaccgacaa caccagcctg gacgacttcc acgtgaacgg cggcgagctg 360

atcctgattc accagaaccc cggcgagttc tgcgtgctgg gaggcggagg atctggcgga 420

ggcggatctc aggtgtcaca ccgctacccc cggattcagt ccattaaggt gcagtttaca 480

gagtataaga aagaaaaagg ctttattctg acttcccaga aagaagatga gattatgaag 540

gtgcaggata attctgtgat catcaattgt gacggcttct acctgatcag cctgaagggc 600

tacttcagcc aggaagtgga catcagcctg cactaccaga aggacgagga acccctgttc 660

cagctgaaga aagtgcggag cgtgaacagc ctgatggtgg ccagcctgac ctacaaggac 720

aaggtgtacc tgaacgtgac caccgacaac accagcctgg acgacttcca cgtgaacggc 780

ggcgagctga tcctgatcca ccagaaccct ggcgagttct gcgtgctggg aggcggaggc 840

tccggagggg gaggatctcg tacggtggct gcaccatctg tctttatctt cccacccagc 900

gaccggaagc tgaagtctgg cacagccagc gtcgtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 960

cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aatgccctgc agagcggcaa cagccaggaa 1020

agcgtgaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 1080

agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg 1140

tctagccccg tgaccaagag cttcaaccgg ggcgagtgcg acaagaccca cacctgtcct 1200

ccatgccctg cccctgaagc tgctggcggc cctagcgtgt tcctgttccc cccaaagccc 1260

aaggacaccc tgatgatcag ccggacccct gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc 1320

cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc 1380

aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1440

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1500

ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1560

gtgtacaccc tgccccatg ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc 1620

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1680

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1740

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1800

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1860

<210> 354
<211> 738
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> OX40L hu monomérico (51-183) - CH1* ADN

<400> 354
caggtgtccc acagataccc cagaatccag agcatcaagg tgcagttcac cgagtacaag 60

aaagagaagg gcttcatcct gaccagccag aaagaggacg agatcatgaa ggtgcaggac 120

aacagcgtga tcatcaactg cgacggcttc tacctgatca gcctgaaggg ctacttcagc 180

caggaagtgg acatcagcct gcactaccag aaggacgagg aacccctgtt ccagctgaag 240

aaagtgcgga gcgtgaacag cctgatggtg gccagcctga cctacaagga caaggtgtac 300

ctgaacgtga ccaccgacaa caccagcctg gacgacttcc acgtgaacgg cggcgagctg 360

atcctgattc accagaaccc cggcgagttc tgcgtgctgg gaggcggagg ttccggaggc 420

ggaggatctg ctagcacaaa gggccccagc gtgttccctc tggccctag cagcaagagc 480

acatctggcg gaacagccgc cctgggctgc ctggtggaag attacttccc cgagcccgtg 540

accgtgtcct ggaattctgg cgccctgaca agcggcgtgc acacctttcc agccgtgctg 600

cagagcagcg gcctgtactc tctgagcagc gtcgtgacag tgcccagcag ctctctgggc 660

acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacgagaag 720

gtggaaccca agtcctgc 738

<210> 355
<211> 620
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> OX40L hu dimérico (51-183) - CL* cadena de botón de Fc

<400> 355

```
Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1               5                  10                  15

Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
            20                  25                  30

Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asp Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
        35                  40                  45

Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asp
    50                  55                  60

Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
65                  70                  75                  80

Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
                85                  90                  95

Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
            100                 105                 110

Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
        115                 120                 125

Glu Phe Cys Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
    130                 135                 140

Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr
145                 150                 155                 160

Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp
                165                 170                 175

Glu Ile Met Lys Val Gln Asp Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly
            180                 185                 190

Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asp Ile
        195                 200                 205

Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys
210                 215                 220

Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp
225                 230                 235                 240

Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe
```

```
                  245                 250                 255

His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu
260                 265                 270

Phe Cys Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr
275                 280                 285

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu
    290                 295                 300

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
305                 310                 315                 320

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                325                 330                 335

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
            340                 345                 350

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
355                 360                 365

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    370                 375                 380

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
385                 390                 395                 400

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
                405                 410                 415

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
420                 425                 430

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
        435                 440                 445

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
    450                 455                 460

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
465                 470                 475                 480

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
485                 490                 495

Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
            500                 505                 510
```

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
515 520 525

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
530 535 540

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
545 550 555 560

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
565 570 575

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
580 585 590

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
595 600 605

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
610 615 620

<210> 356
<211> 246
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> OX40L hu monomérico (51-183) - CH1*

<400> 356

Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1 5 10 15

Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
20 25 30

Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asp Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
35 40 45

Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asp
50 55 60

Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
65 70 75 80

Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
85 90 95

Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
100 105 110

Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly

```
        115                 120                 125

Glu Phe Cys Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
130                 135                 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
145                 150                 155                 160

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe
                165                 170                 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
180                 185                 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
195                 200                 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
210                 215                 220

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys
225                 230                 235                 240

Val Glu Pro Lys Ser Cys
                245
```

<210> 357
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 357

```
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> 358
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 358

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> 359
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH CD19 (8B8-7H07)

<400> 359

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 Ser Glu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 360
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL CD19 (8B8-7H07)

<400> 360

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 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 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 Ala
85 90 95

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

<210> 361
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH CD19 (8B8-2B03)

<400> 361

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 Thr 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 Asp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 362
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL CD19 (8B8-2B03)

<220>
<221> misc_feature
<222> (107)..(107)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 362

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 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 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 Xaa Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 363
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH CD19 (8B8-5A07)

<400> 363

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 Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 364
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL CD19 (8B8-5A07)

<400> 364

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 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 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 Pro
85 90 95

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

<210> 365
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH CD19 (8B8-5D08)

<400> 365

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 Ser Glu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 366
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL CD19 (8B8-5D08)

<400> 366

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

<210> 367
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH CD19 (8B8-5B08)

<400> 367

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> 368
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL CD19 (8B8-5B08)

<400> 368

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 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 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

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

<210> 369
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH CD19 (8B8-5H09)

<400> 369

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 Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 370
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL CD19 (8B8-5H09)

<400> 370

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 Ser Ser
20 25 30

Thr 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 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

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

<210> 371
<211> 276

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> huOX40L dimérico (51-183) conectado por conector (G4S)2

<400> 371

Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1 5 10 15

Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
20 25 30

Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
35 40 45

Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn
50 55 60

Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
65 70 75 80

Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
85 90 95

Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
100 105 110

Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
115 120 125

Glu Phe Cys Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr
145 150 155 160

Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp
165 170 175

Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly
180 185 190

Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile
195 200 205

Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys
210 215 220

Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp
225 230 235 240

Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe
245 250 255

His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu
260 265 270

Phe Cys Val Leu
275

<210> 372
<211> 274
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> huOX40L dimérico (52-183) conectado por conector (G4S)2

<400> 372

Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr
1 5 10 15

Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp
20 25 30

Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly
35 40 45

Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile
50 55 60

Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys
65 70 75 80

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

Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe
100 105 110

His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu
115 120 125

Phe Cys Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Ser
130 135 140

His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr
145 150 155 160

Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile
165 170 175

Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr
180 185 190

Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu
195 200 205

His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg
210 215 220

Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val
225 230 235 240

Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val
245 250 255

Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys
260 265 270

Val Leu

<210> 373
<211> 164
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu (85-248)

<400> 373

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

<210> 374
<211> 169
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu (80-248)

<400> 374

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> 375
<211> 197
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BBL hu (52-248)

<400> 375

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

Fig. 1

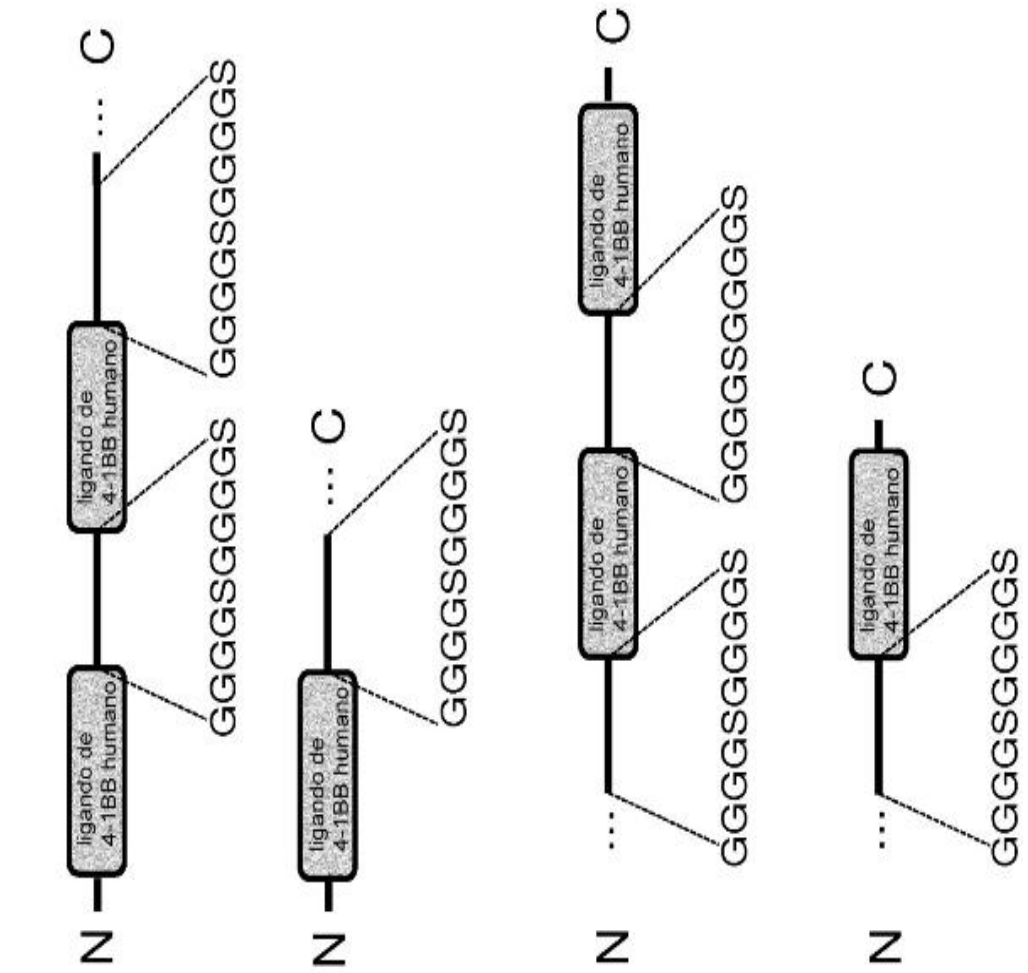
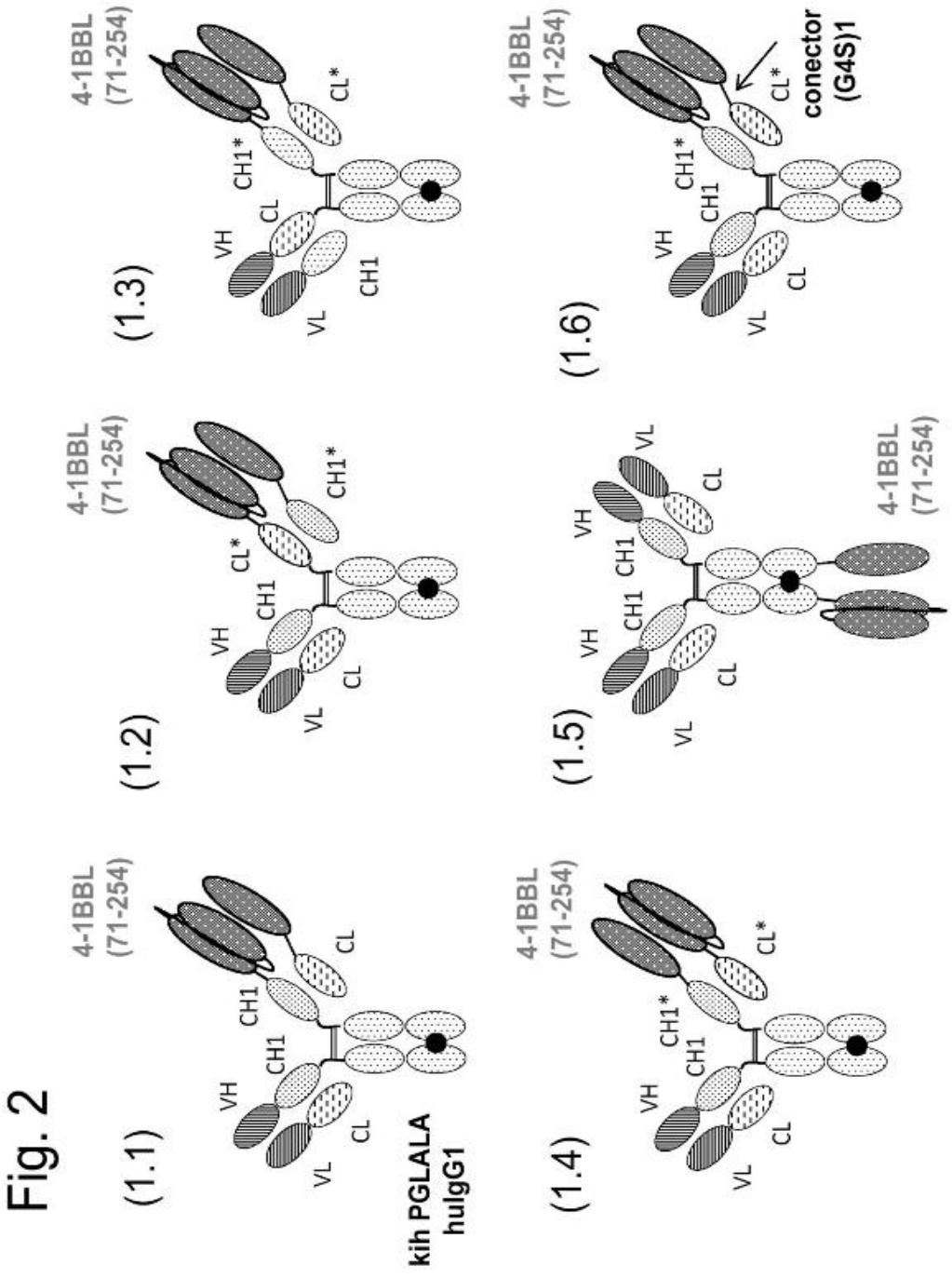

(1A)
N
ligando de 4-1BB humano
GGGGSGGGGS
ligando de 4-1BB humano
GGGGSGGGGS
... C
(1B)
N
ligando de 4-1BB humano
GGGGSGGGGS
... C
(1C)
N
...
GGGGSGGGGS
ligando de 4-1BB humano
GGGGSGGGGS
ligando de 4-1BB humano
... C
(1D)
N
...
GGGGSGGGGS
ligando de 4-1BB humano
... C

Fig. 2


(1.1)
4-1BBL (71-254)
VH
CH1
CH1
CL
VL
CL
kih PGLALA hulgG1
(1.2)
4-1BBL (71-254)
VH
CL*
CH1
CH1*
VL
CL
(1.3)
4-1BBL (71-254)
VH
CH1*
CL
CL*
VL
CH1
(1.4)
4-1BBL (71-254)
VH
CH1*
CH1
CL*
VL
CL
(1.5)
VL
VH
CL
CH1
CH1
VH
VL
CL
4-1BBL (71-254)
(1.6)
4-1BBL (71-254)
CL*
conector (G4S)1
VH
CH1*
CH1
VL
CL

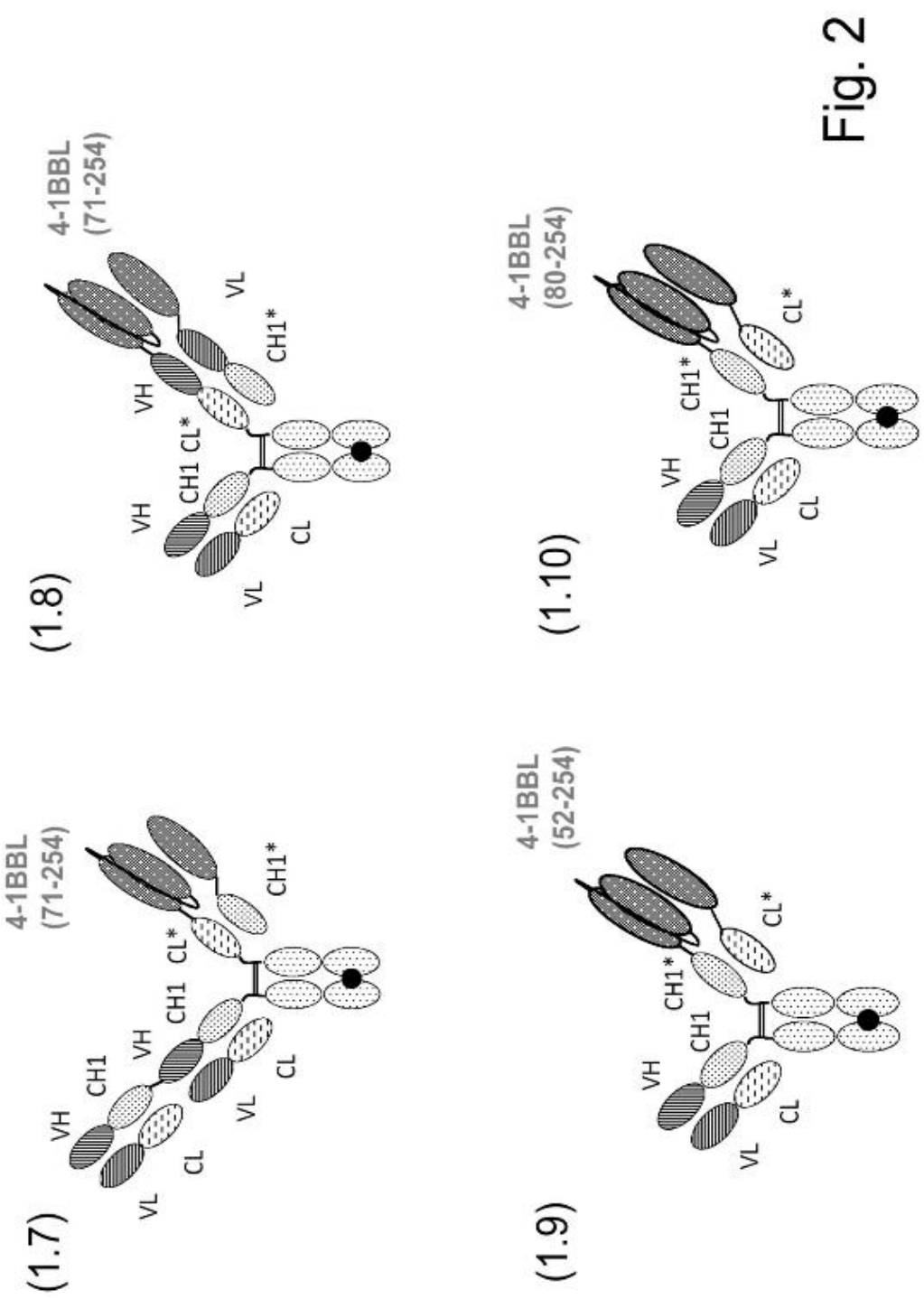

4-1BBL
(71-254)
VH
CH1
VL
CL
CH1*
CL*
(1.7)
(1.8)
(1.9)
(1.10)
4-1BBL
(52-254)
4-1BBL
(80-254)

Fig. 2

Fig. 3

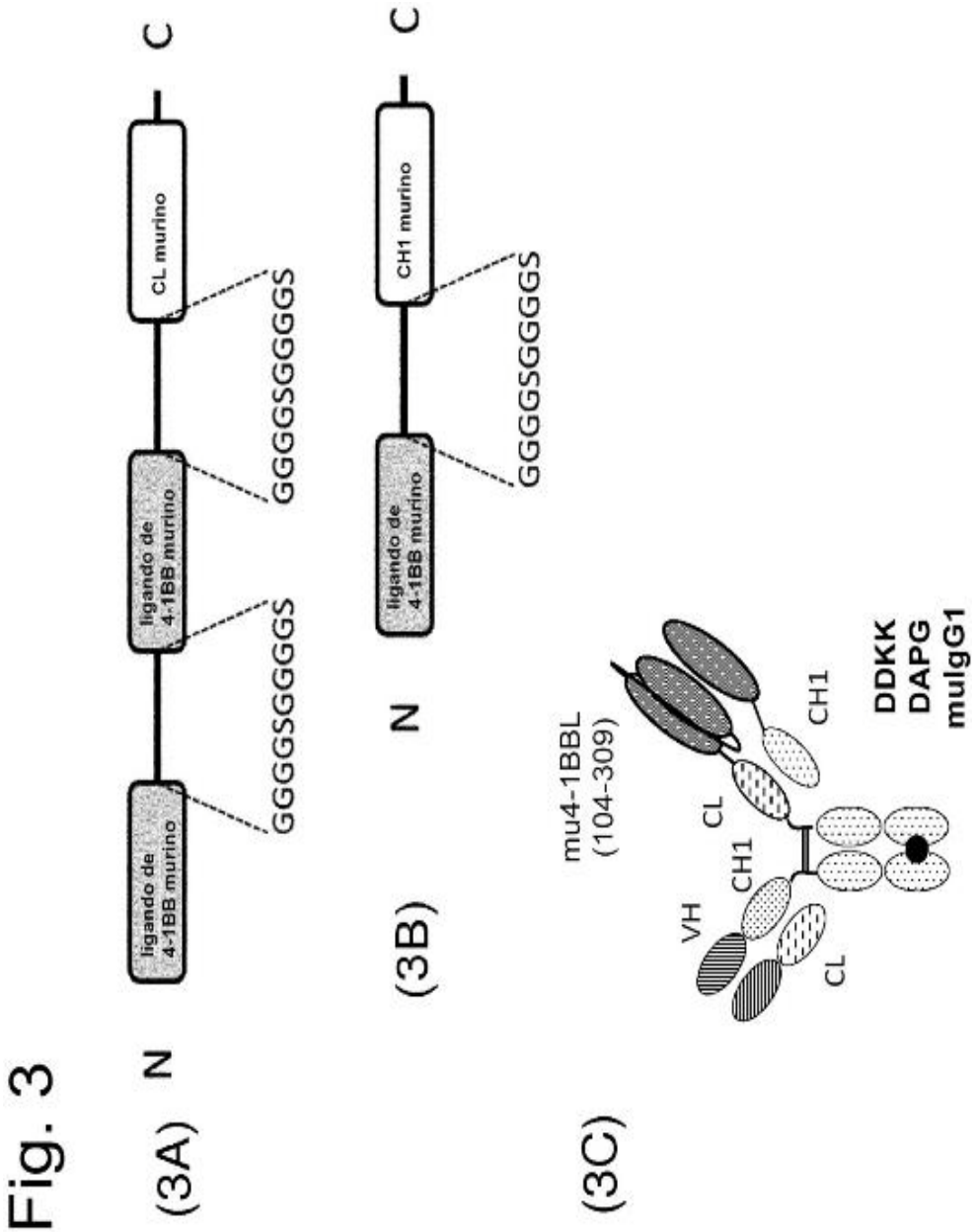
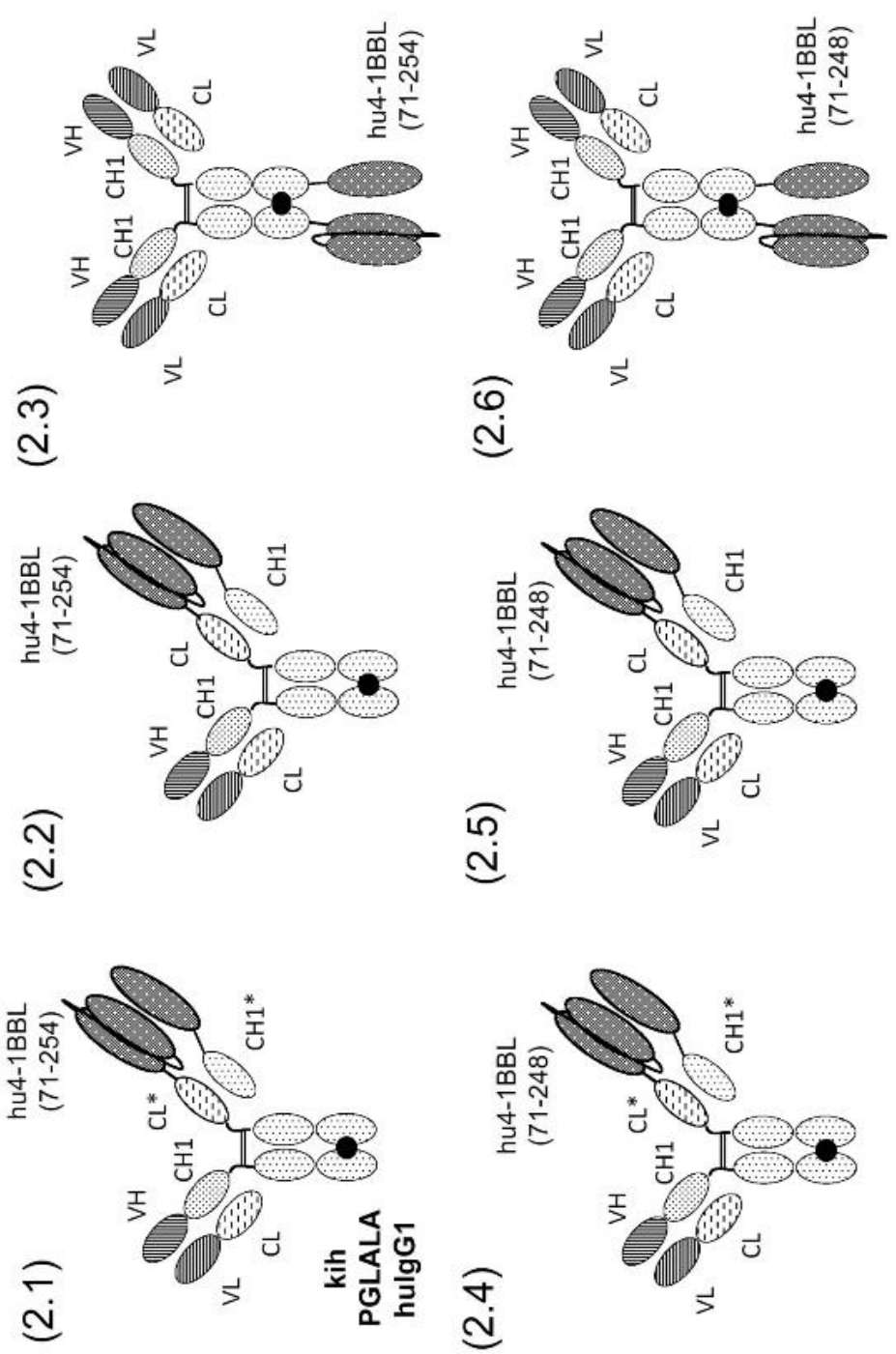

(3A)
N
ligando de 4-1BB murino
GGGGSGGGGS
ligando de 4-1BB murino
GGGGSGGGGS
CL murino
C
(3B)
N
ligando de 4-1BB murino
GGGGSGGGGS
CH1 murino
C
(3C)
mu4-1BBL (104-309)
VH
CH1
CL
CL
CH1
DDKK
DAPG
mulgG1

Fig. 4


(2.1)
hu4-1BBL (71-254)
VH
CH1
CL*
CH1*
VL
CL
kih PGLALA huIgG1
(2.2)
hu4-1BBL (71-254)
VH
CH1
CL
CH1
VL
CL
(2.3)
VH
CH1
VL
CL
VH
CH1
VL
CL
hu4-1BBL (71-254)
(2.4)
hu4-1BBL (71-248)
VH
CH1
CL*
CH1*
VL
CL
(2.5)
hu4-1BBL (71-248)
VH
CH1
CL
CH1
VL
CL
(2.6)
VH
CH1
VL
CL
VH
CH1
VL
CL
hu4-1BBL (71-248)

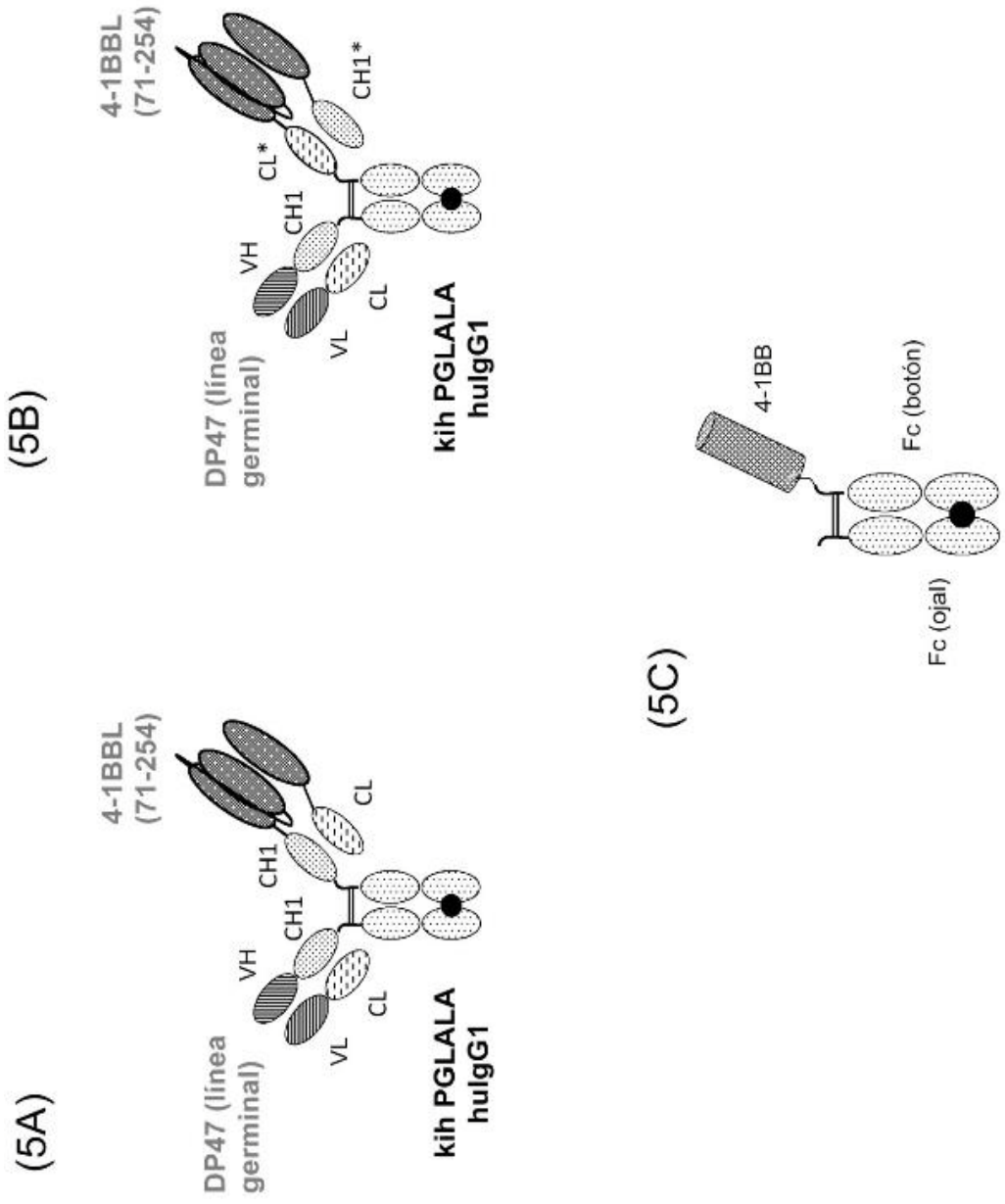

(5A)
4-1BBL (71-254)
CH1
CL
VH
CH1
VL
CL
DP47 (línea germinal)
kih PGLALA hulgG1
(5B)
4-1BBL (71-254)
CL*
CH1*
VH
CH1
VL
CL
DP47 (línea germinal)
kih PGLALA hulgG1
(5C)
4-1BB
Fc (botón)
Fc (ojal)

Fig. 5

Fig. 6

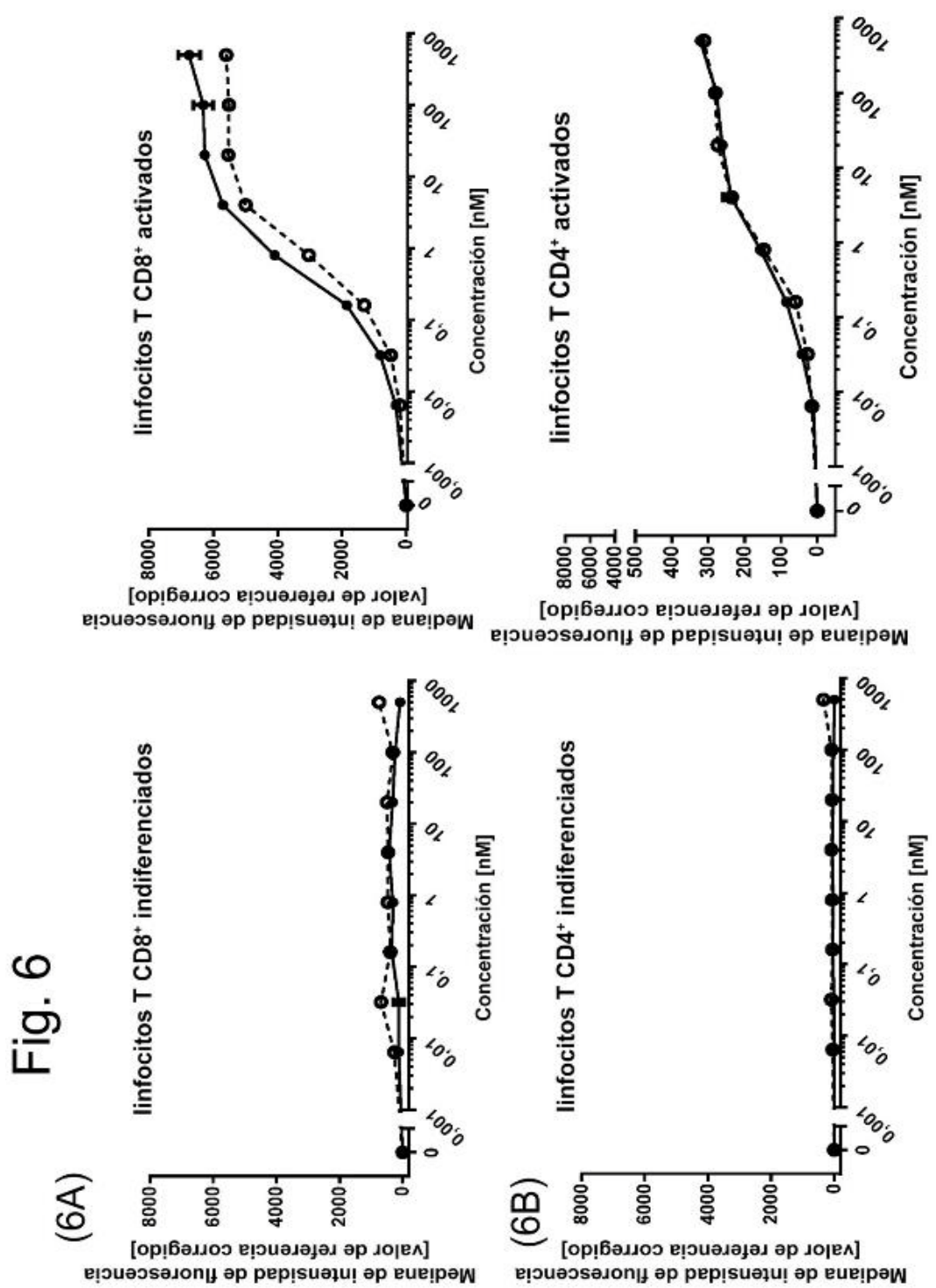
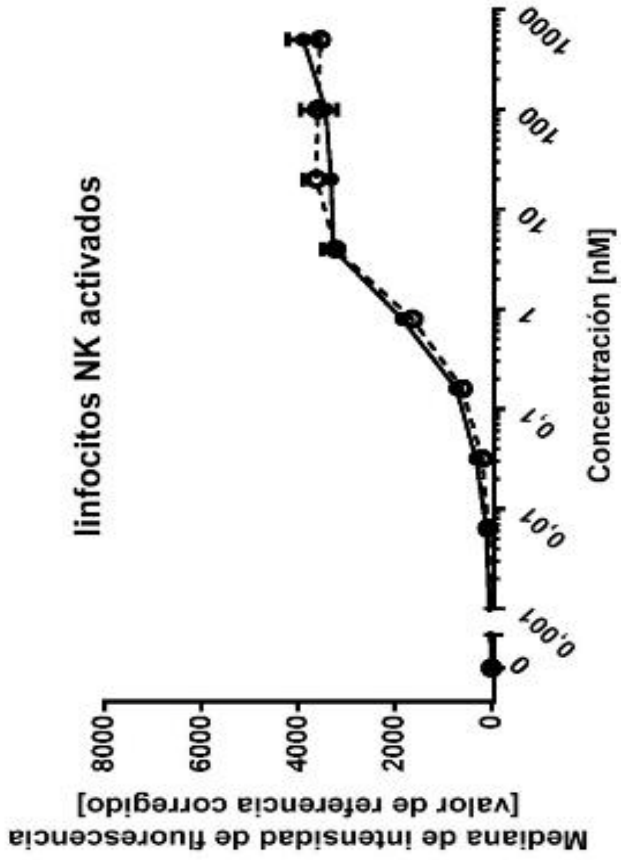

(6A)
linfocitos T CD8+ indiferenciados
Mediana de intensidad de fluorescencia [valor de referencia corregido]
Concentración [nM]
linfocitos T CD8+ activados
Mediana de intensidad de fluorescencia [valor de referencia corregido]
Concentración [nM]
(6B)
linfocitos T CD4+ indiferenciados
Mediana de intensidad de fluorescencia [valor de referencia corregido]
Concentración [nM]
linfocitos T CD4+ activados
Mediana de intensidad de fluorescencia [valor de referencia corregido]
Concentración [nM]

Fig. 6

(6C)


linfocitos NK activados
Mediana de intensidad de fluorescencia
[valor de referencia corregido]
8000
6000
4000
2000
0
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentración [nM]

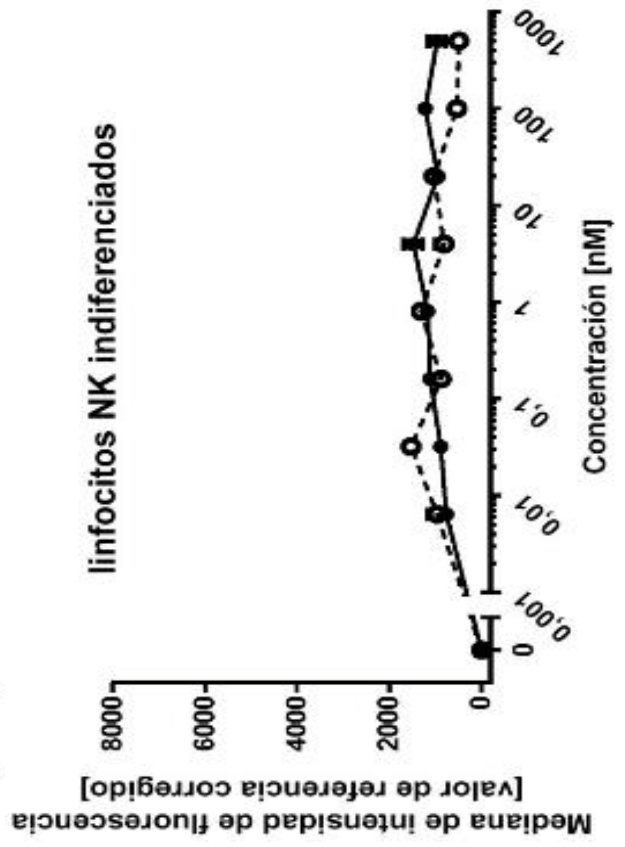

linfocitos NK indiferenciados
Mediana de intensidad de fluorescencia
[valor de referencia corregido]
8000
6000
4000
2000
0
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentración [nM]

Fig. 7A

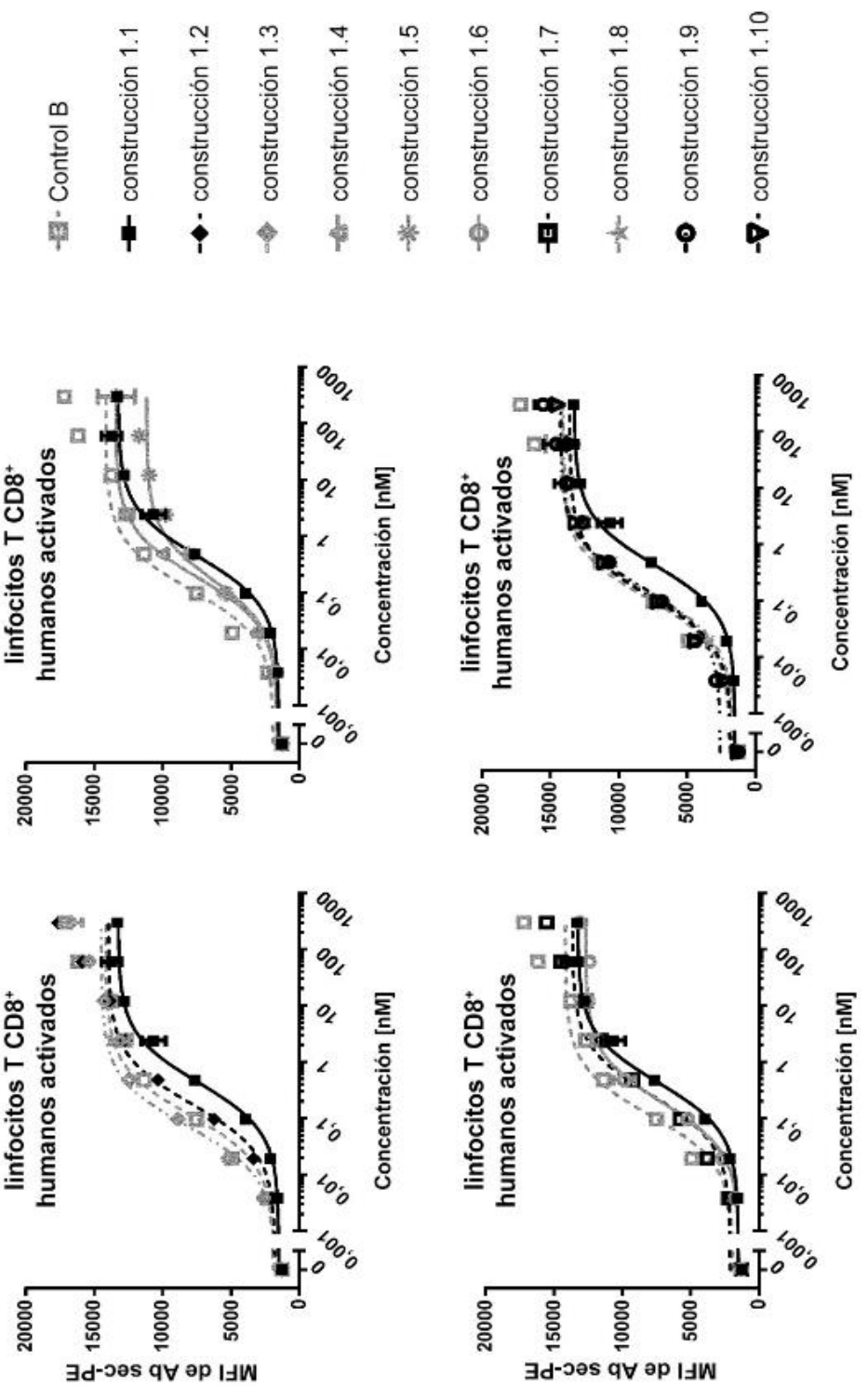

Control B
construcción 1.1
construcción 1.2
construcción 1.3
construcción 1.4
construcción 1.5
construcción 1.6
construcción 1.7
construcción 1.8
construcción 1.9
construcción 1.10
linfocitos T CD8+ humanos activados
MFI de Ab sec-PE
Concentración [nM]
0
5000
10000
15000
20000
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000

Fig. 7B

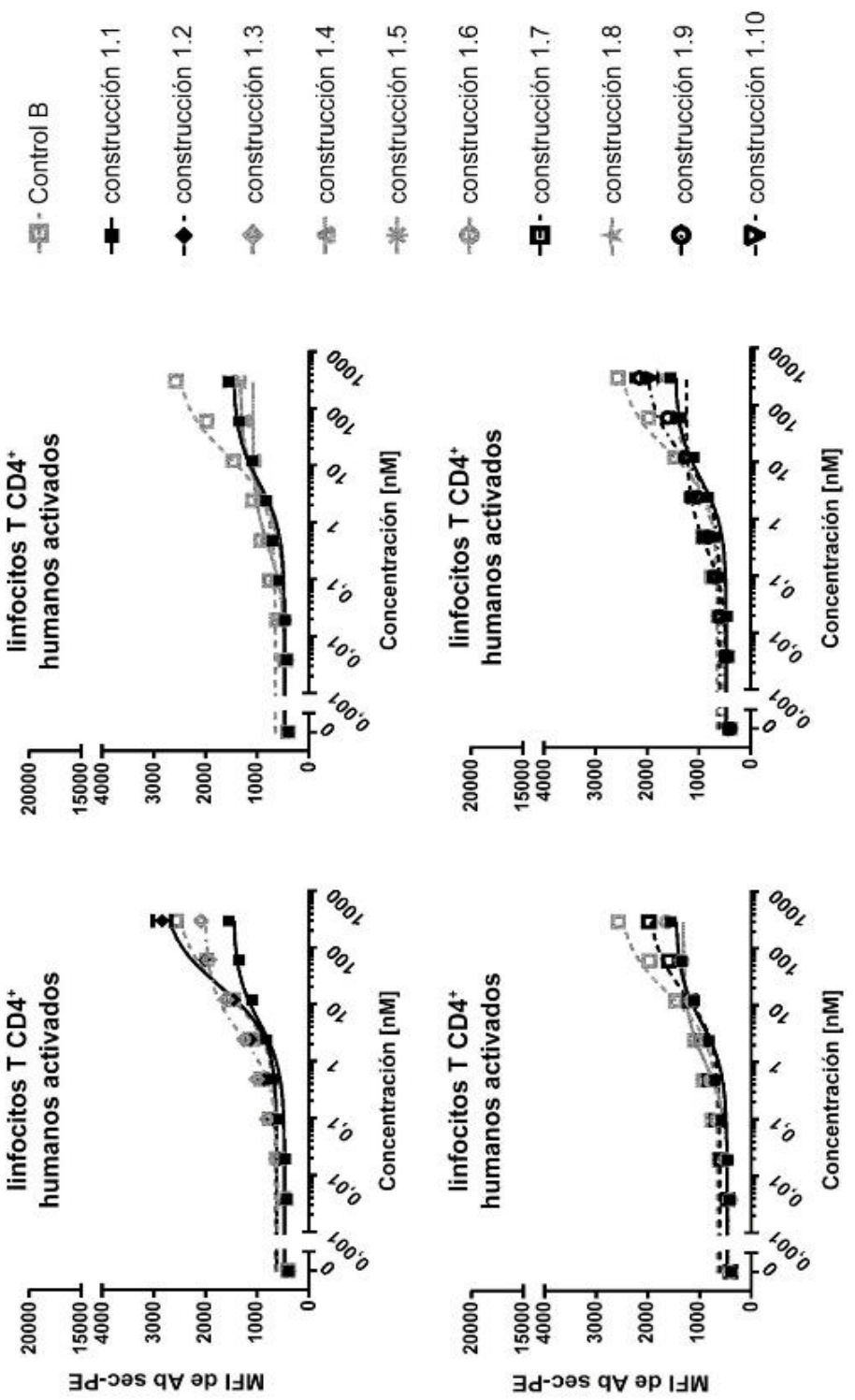

linfocitos T CD4+ humanos activados
MFI de Ab sec-PE
Concentración [nM]
Control B
construcción 1.1
construcción 1.2
construcción 1.3
construcción 1.4
construcción 1.5
construcción 1.6
construcción 1.7
construcción 1.8
construcción 1.9
construcción 1.10

Fig. 8A

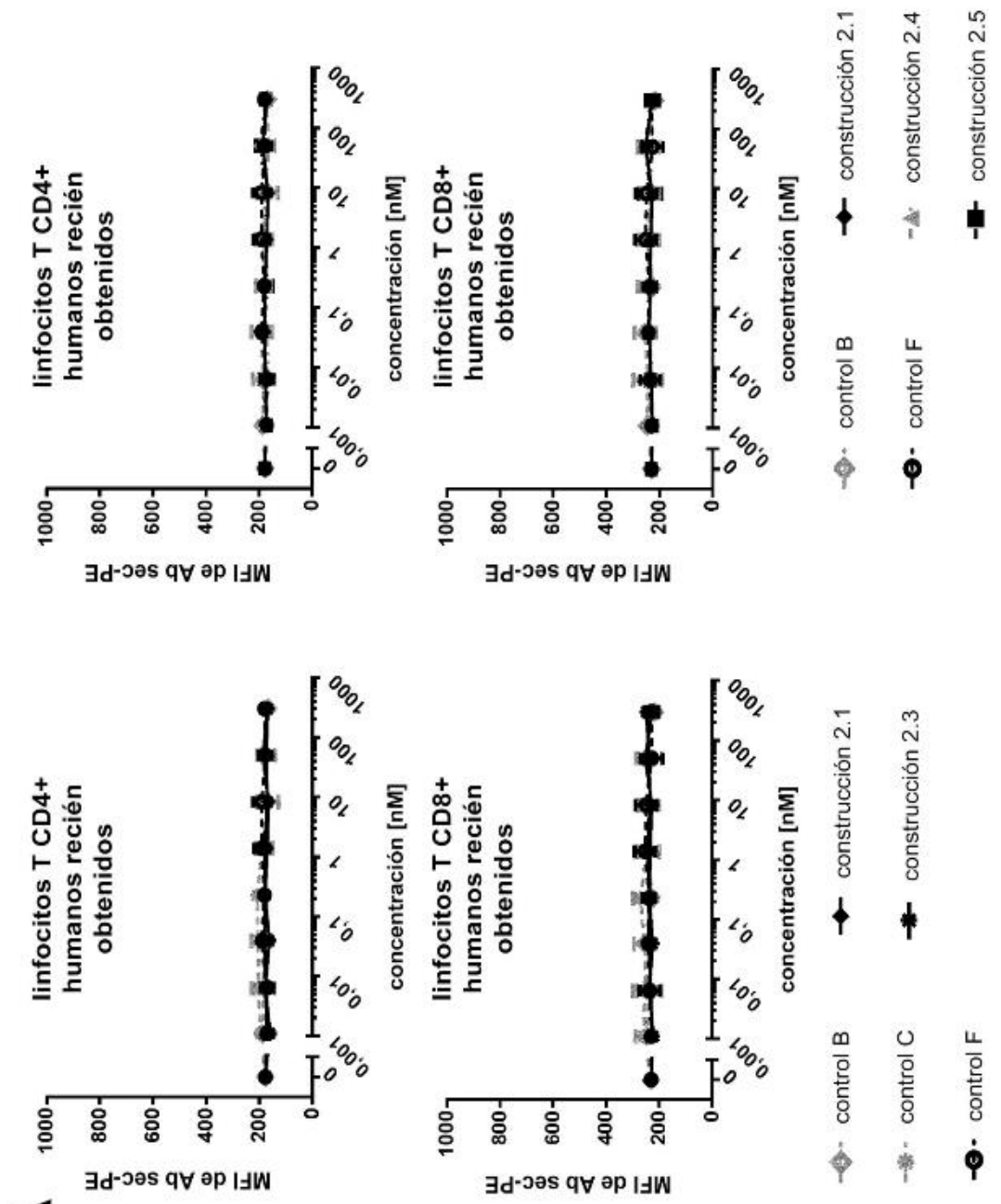

linfocitos T CD4+ humanos recién obtenidos
MFI de Ab sec-PE
concentración [nM]
linfocitos T CD8+ humanos recién obtenidos
control B
construcción 2.1
control F
construcción 2.4
control C
construcción 2.3
construcción 2.5

Fig. 8B

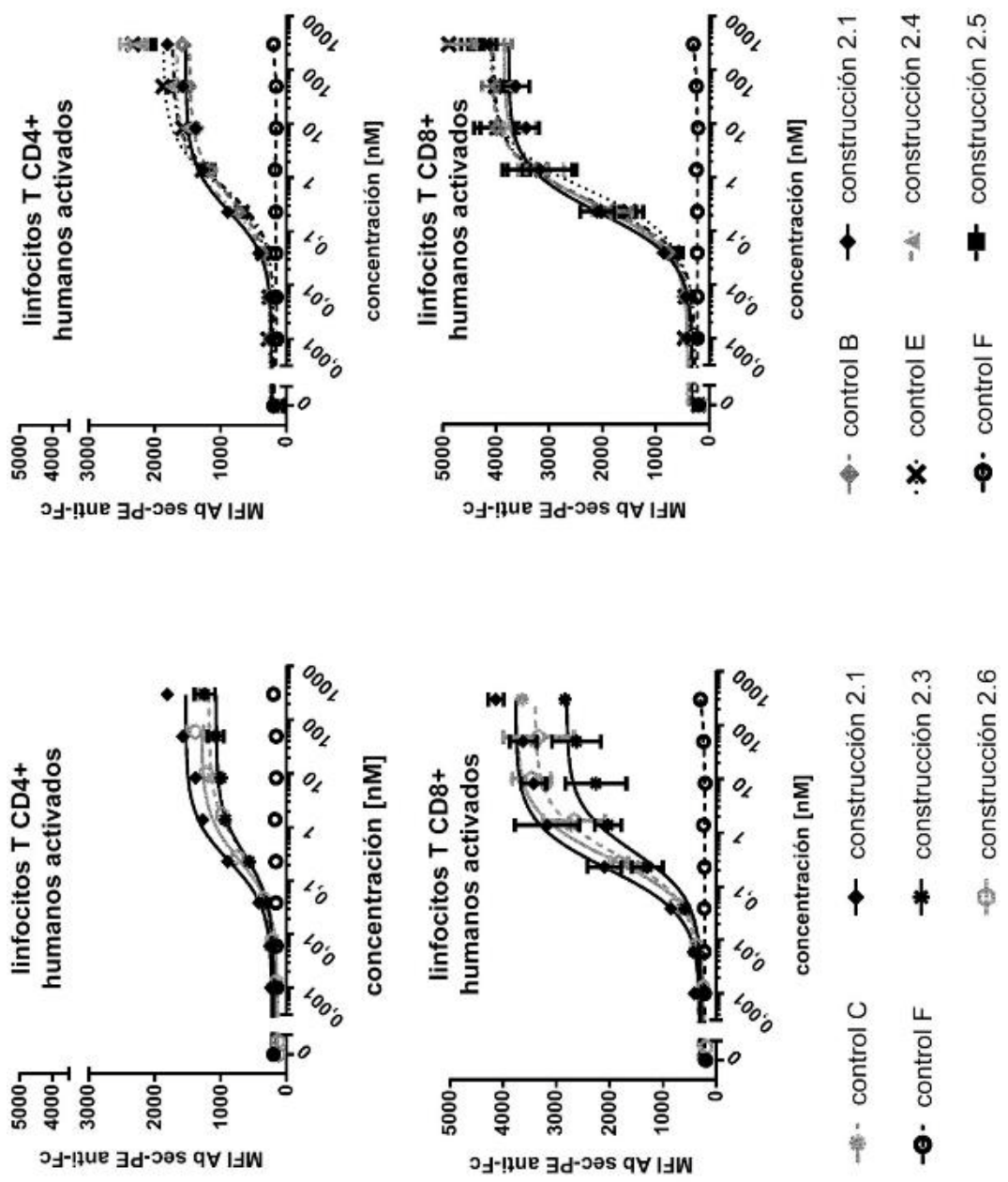
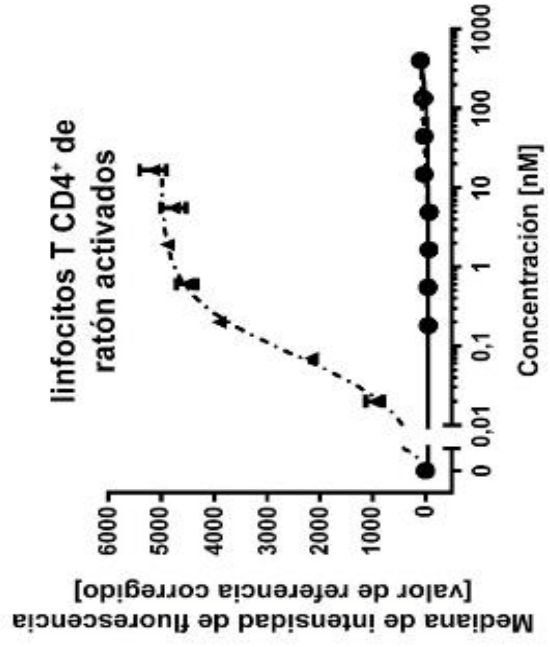

linfocitos T CD4+
humanos activados
MFI Ab sec-PE anti-Fc
concentración [nM]
linfocitos T CD8+
humanos activados
control B
construcción 2.1
control E
construcción 2.4
control F
construcción 2.5
control C
construcción 2.1
control F
construcción 2.3
construcción 2.6

Fig. 9

(9A)


linfocitos T CD4+ de ratón activados
Mediana de intensidad de fluorescencia [valor de referencia corregido]
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentración [nM]

(9B)

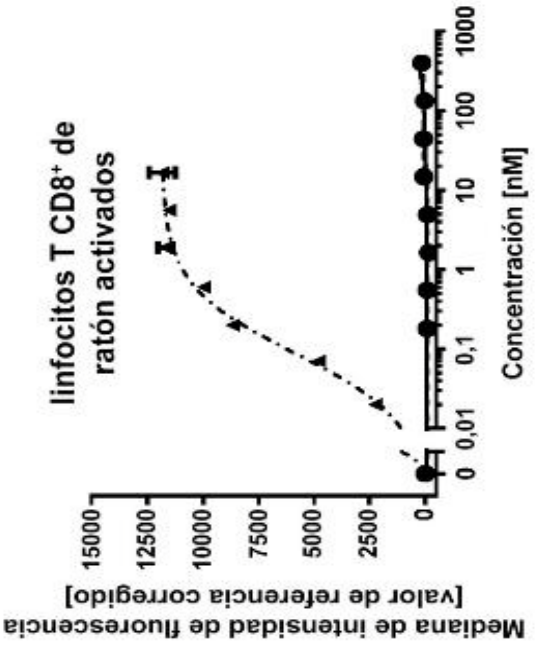
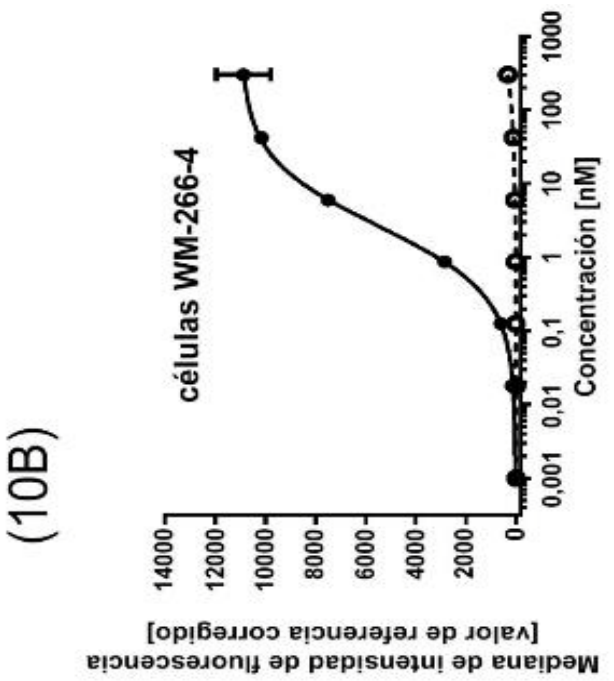

linfocitos T CD8+ de ratón activados
Mediana de intensidad de fluorescencia [valor de referencia corregido]
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentración [nM]

Fig. 10


(10B)
células WM-266-4
Mediana de intensidad de fluorescencia
[valor de referencia corregido]
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentración [nM]

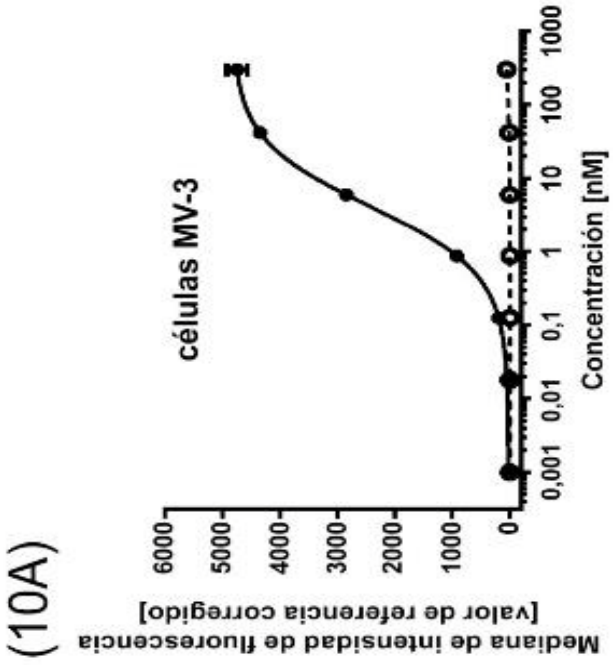

(10A)
células MV-3
Mediana de intensidad de fluorescencia
[valor de referencia corregido]
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentración [nM]

Fig. 11A

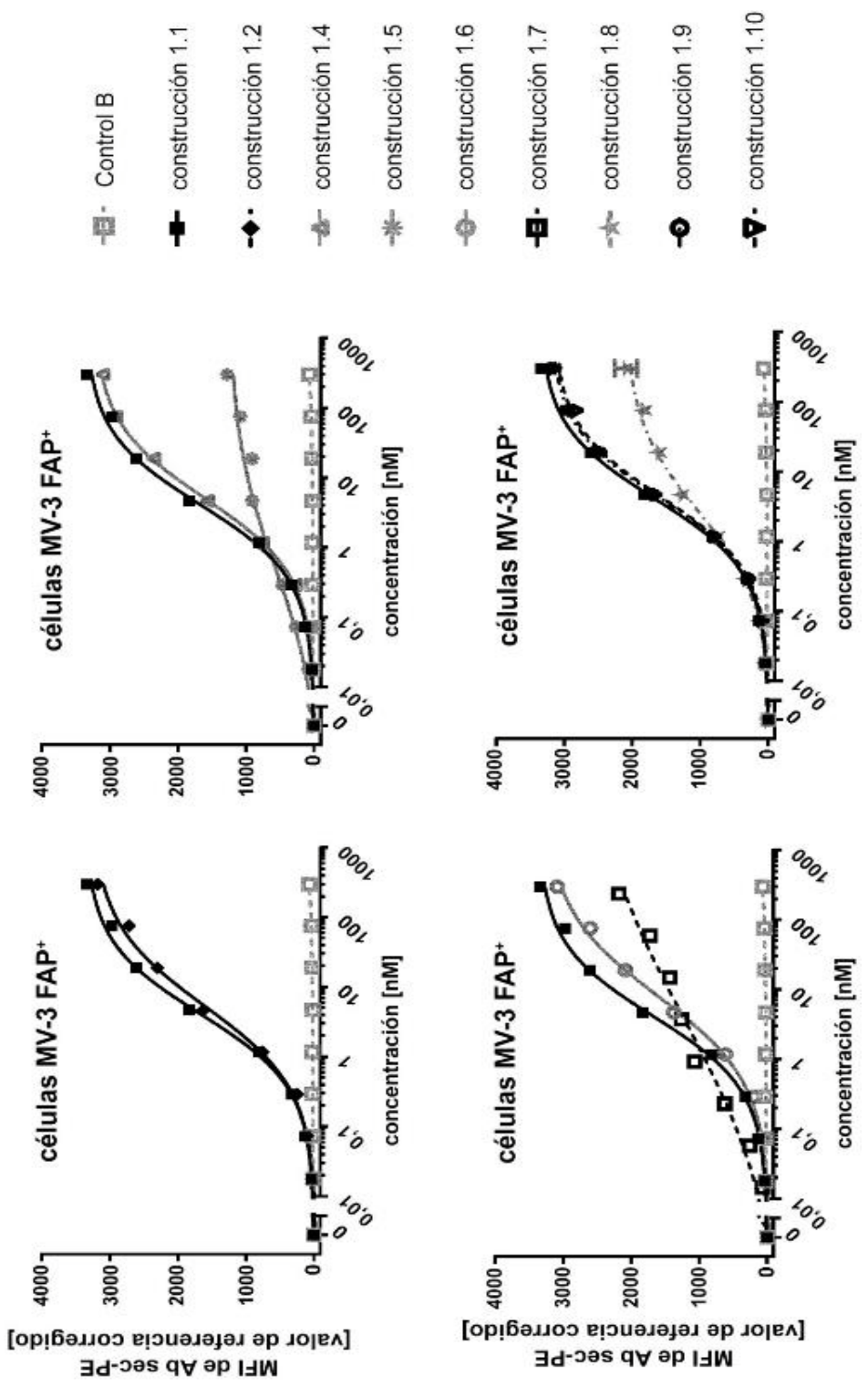

Control B
construcción 1.1
construcción 1.2
construcción 1.4
construcción 1.5
construcción 1.6
construcción 1.7
construcción 1.8
construcción 1.9
construcción 1.10
células MV-3 FAP+
células MV-3 FAP+
células MV-3 FAP+
células MV-3 FAP+
concentración [nM]
concentración [nM]
concentración [nM]
concentración [nM]
MFI de Ab sec-PE [valor de referencia corregido]
MFI de Ab sec-PE [valor de referencia corregido]
0
1000
2000
3000
4000
0,01
0,1
1
10
100
1000

Fig. 11B

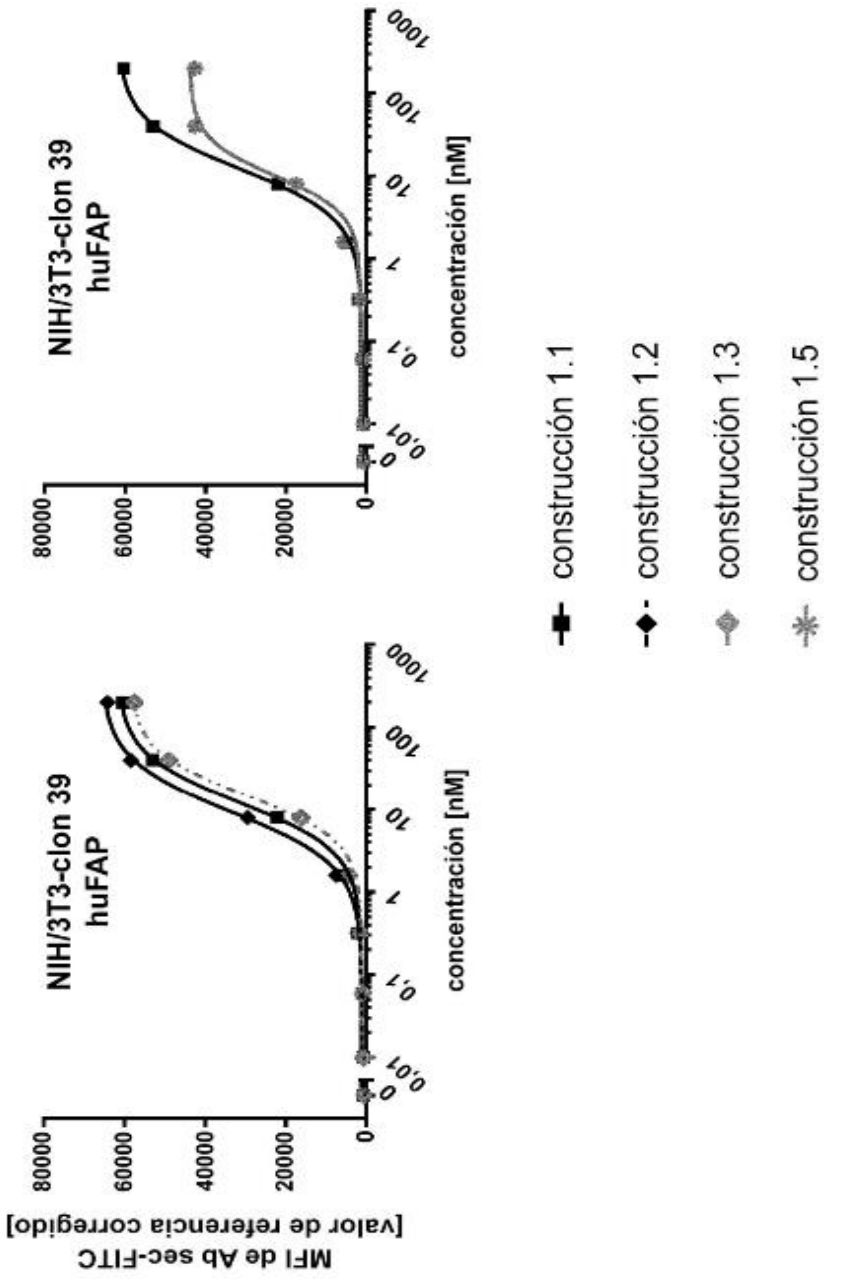

NIH/3T3-clon 39
huFAP
MFI de Ab sec-FITC
[valor de referencia corregido]
concentración [nM]
construcción 1.1
construcción 1.2
construcción 1.3
construcción 1.5

Fig. 12A

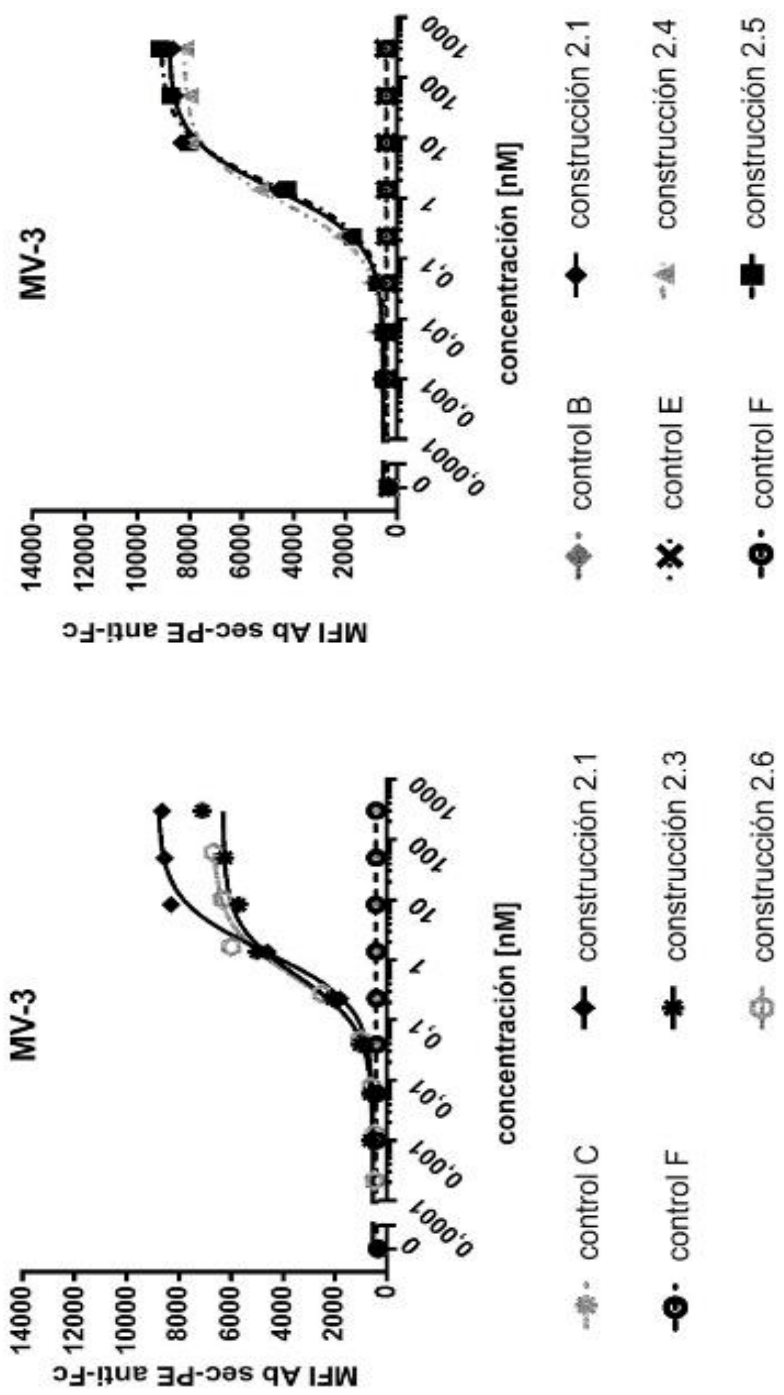

MV-3
MFI Ab sec-PE anti-Fc
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
concentración [nM]
control C
construcción 2.1
control F
construcción 2.3
construcción 2.6
MV-3
MFI Ab sec-PE anti-Fc
concentración [nM]
control B
construcción 2.1
control E
construcción 2.4
control F
construcción 2.5

Fig. 12B

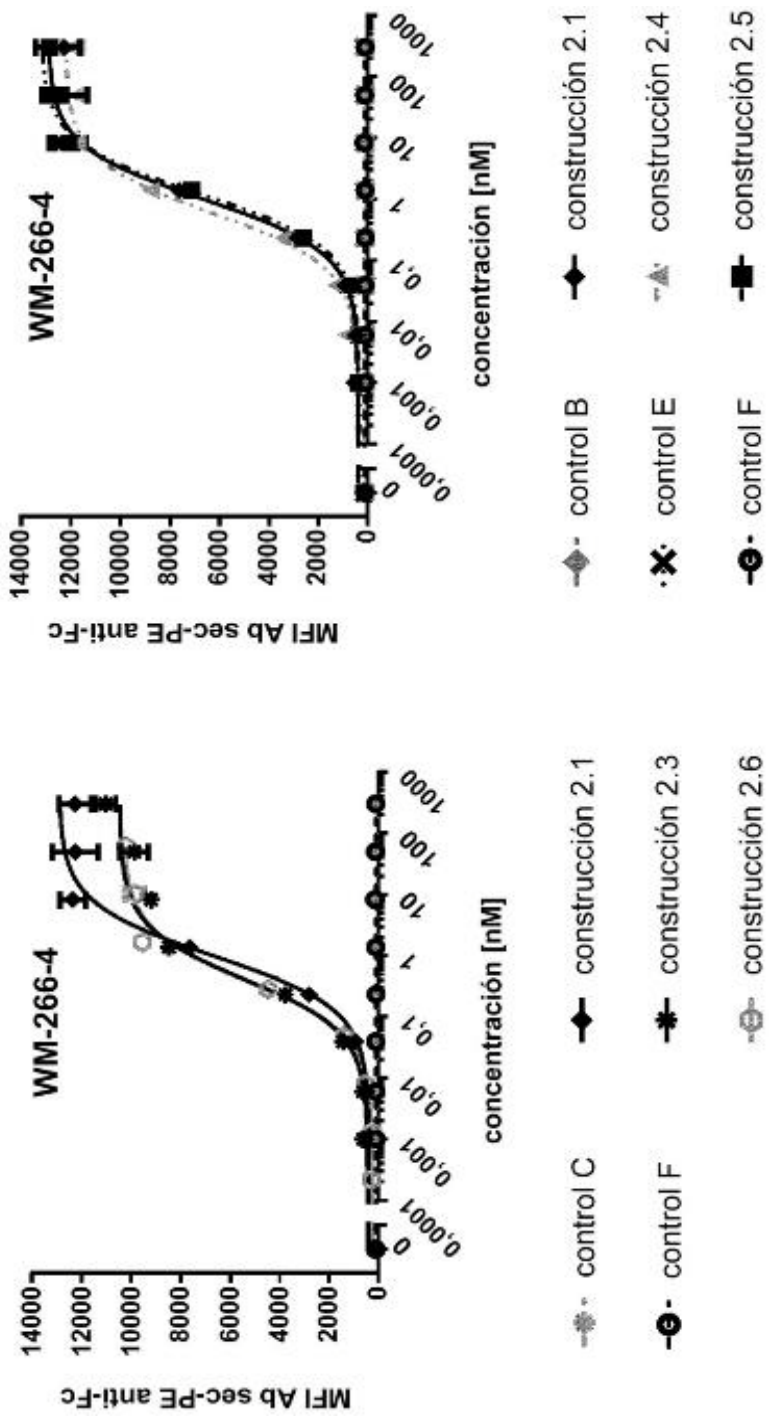

WM-266-4
MFI Ab sec-PE anti-Fc
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
concentración [nM]
control C
control F
construcción 2.1
construcción 2.3
construcción 2.6
WM-266-4
MFI Ab sec-PE anti-Fc
concentración [nM]
control B
control E
control F
construcción 2.1
construcción 2.4
construcción 2.5

Fig. 13

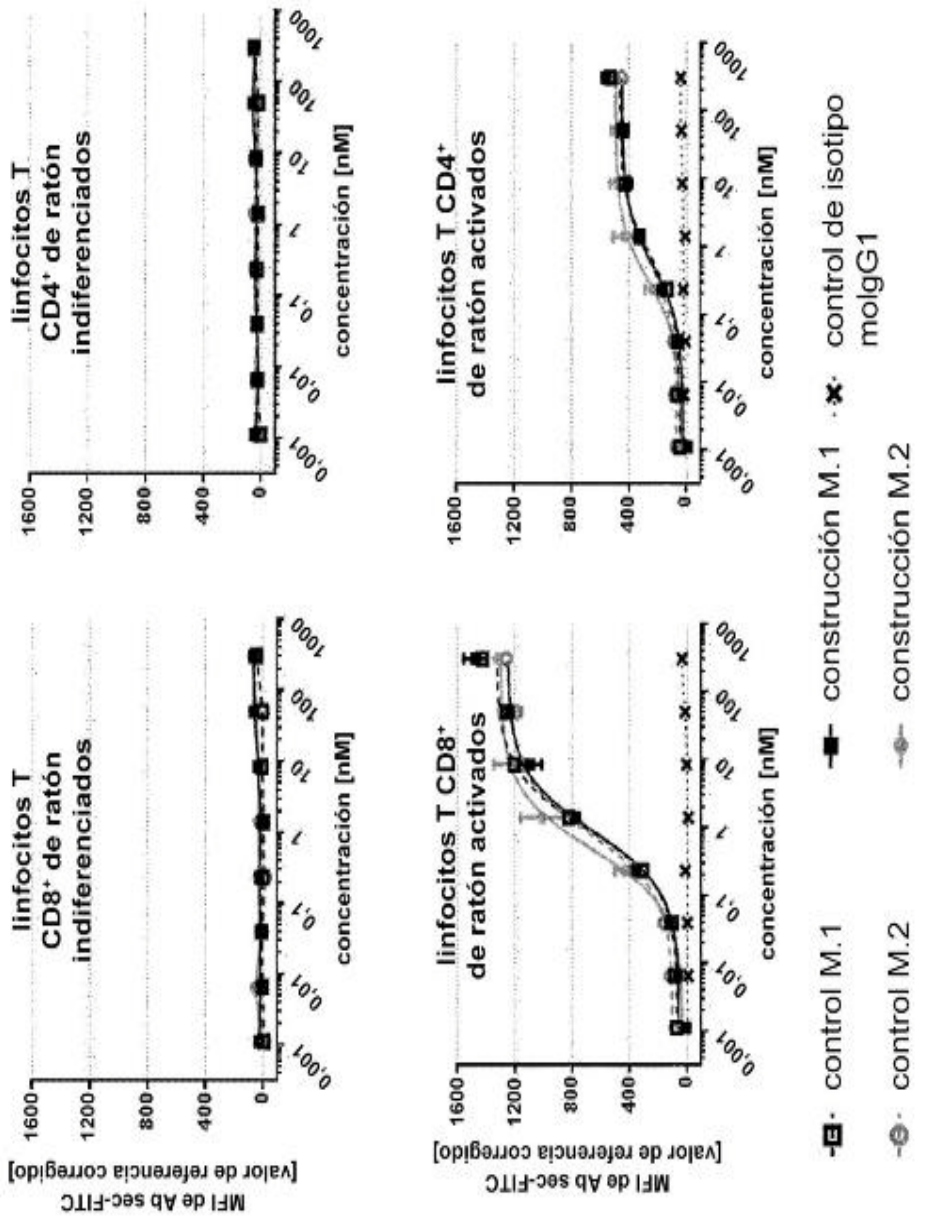
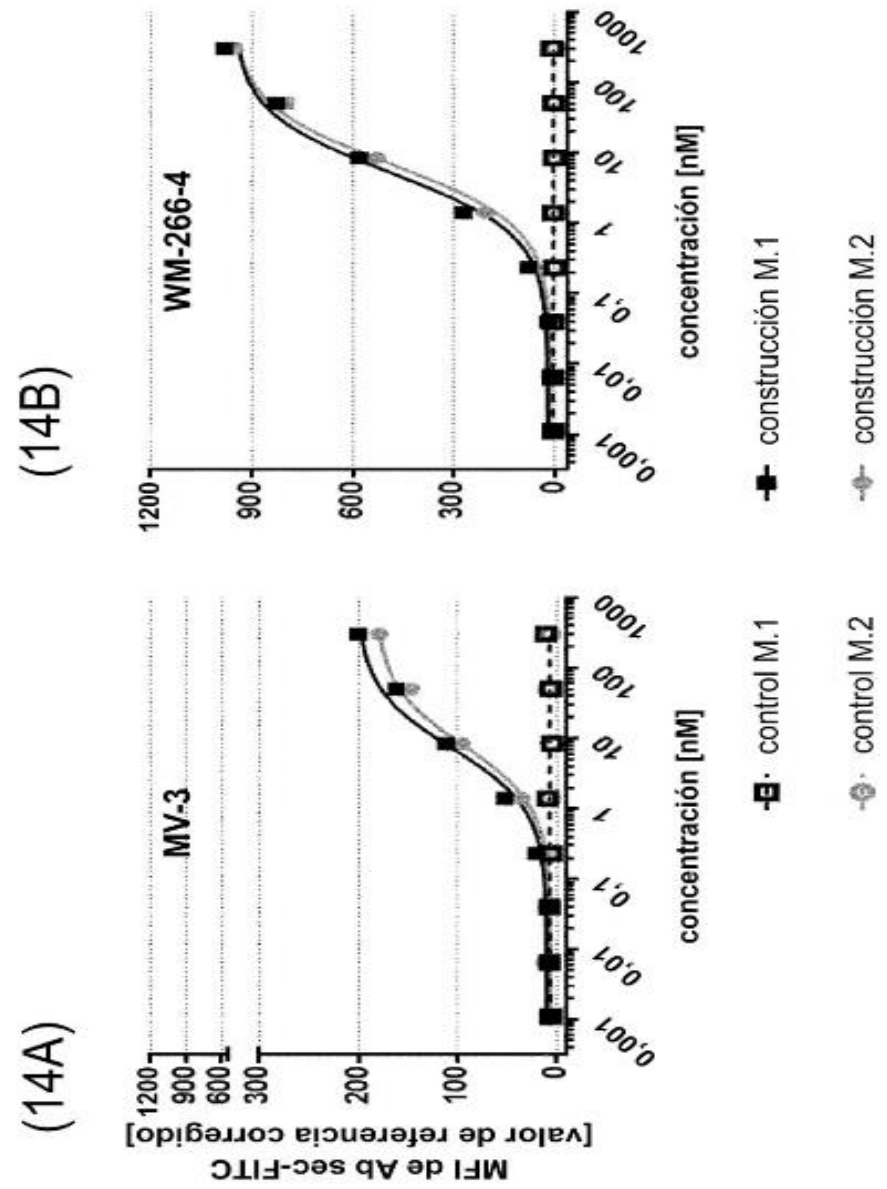

(13A)
linfocitos T CD8+ de ratón indiferenciados
linfocitos T CD4+ de ratón indiferenciados
MFI de Ab sec-FITC [valor de referencia corregido]
concentración [nM]
(13B)
linfocitos T CD8+ de ratón activados
linfocitos T CD4+ de ratón activados
control M.1
control M.2
construcción M.1
construcción M.2
control de isotipo molgG1

Fig. 14


(14A)
MV-3
MFI de Ab sec-FITC
[valor de referencia corregido]
1200
900
600
300
200
100
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
concentración [nM]
control M.1
control M.2
(14B)
WM-266-4
1200
900
600
300
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
concentración [nM]
construcción M.1
construcción M.2

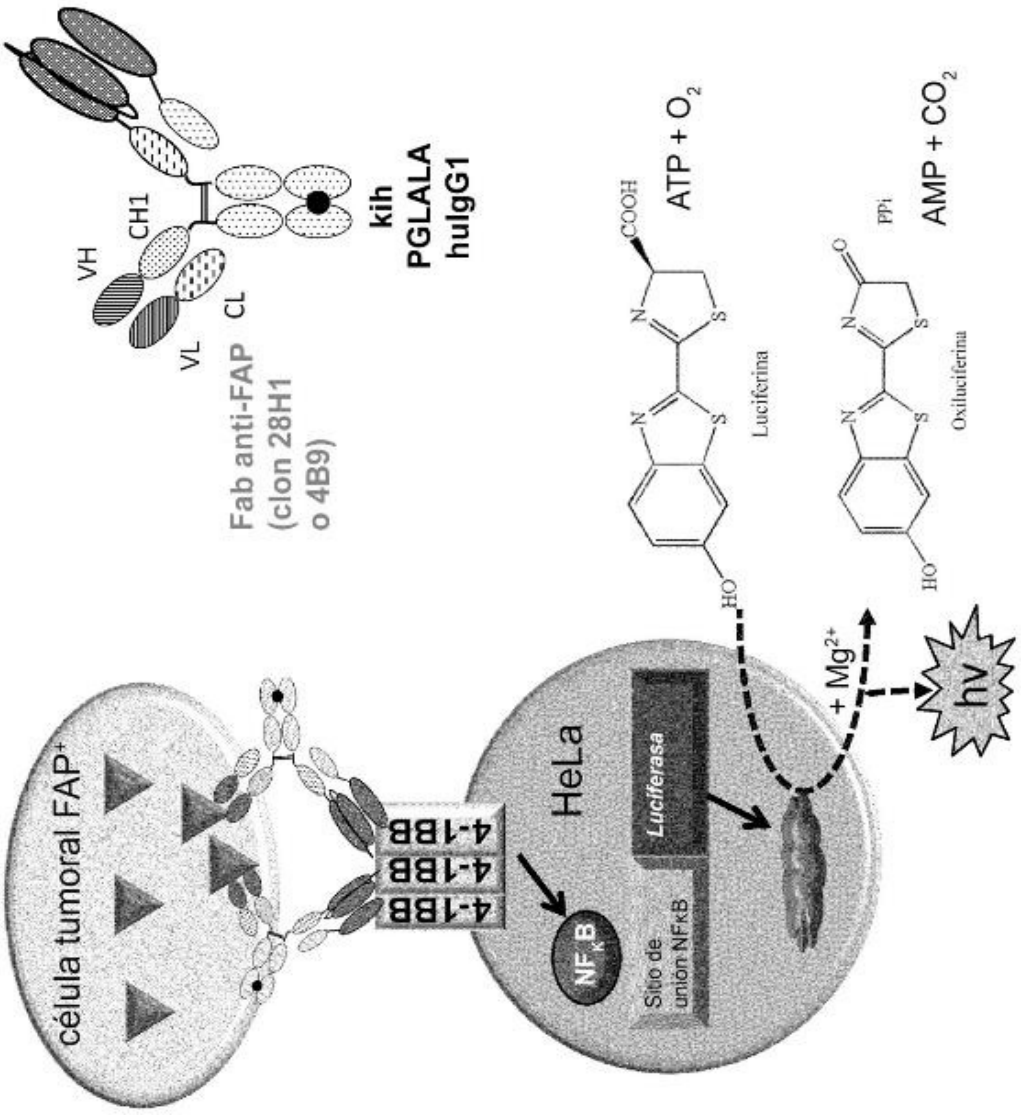
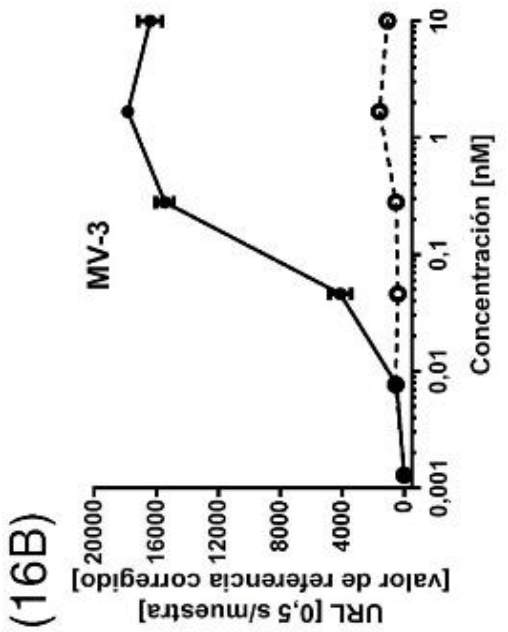
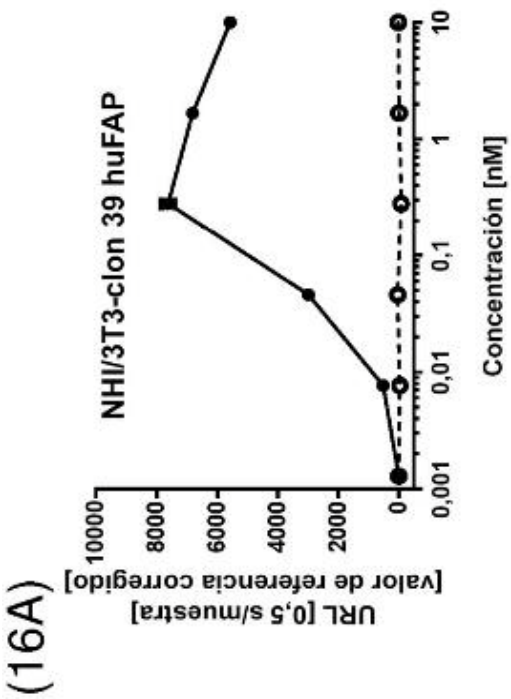

célula tumoral FAP+
4-1BB
4-1BB
4-1BB
HeLa
NFκB
Sitio de unión NFκB
Luciferasa
Fab anti-FAP (clon 28H1 o 4B9)
VH
CH1
VL
CL
kih
PGLALA
hulgG1
Luciferina
ATP + O2
Oxiluciferina
AMP + CO2
PPi
+ Mg2+
hv

Fig. 15


(16B)
MV-3
URL [0,5 s/muestra]
[valor de referencia corregido]
20000
16000
12000
8000
4000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Concentración [nM]


(16A)
NHI/3T3-clon 39 huFAP
URL [0,5 s/muestra]
[valor de referencia corregido]
10000
8000
6000
4000
2000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Concentración [nM]

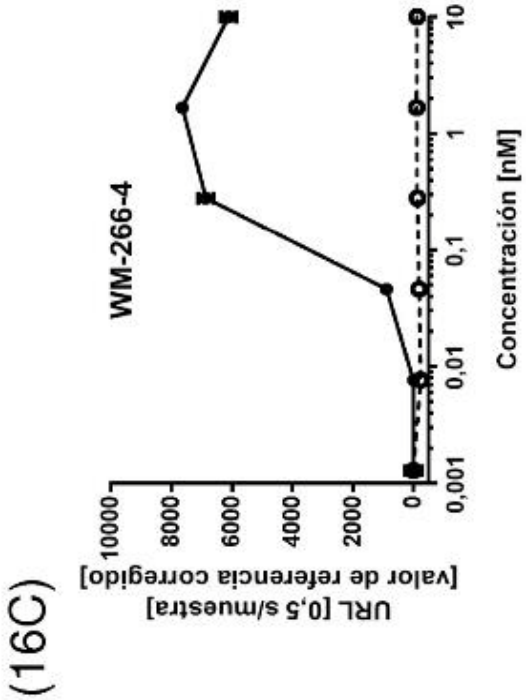

(16C)
WM-266-4
URL [0,5 s/muestra]
[valor de referencia corregido]
10000
8000
6000
4000
2000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Concentración [nM]

Fig. 16

Fig. 17A

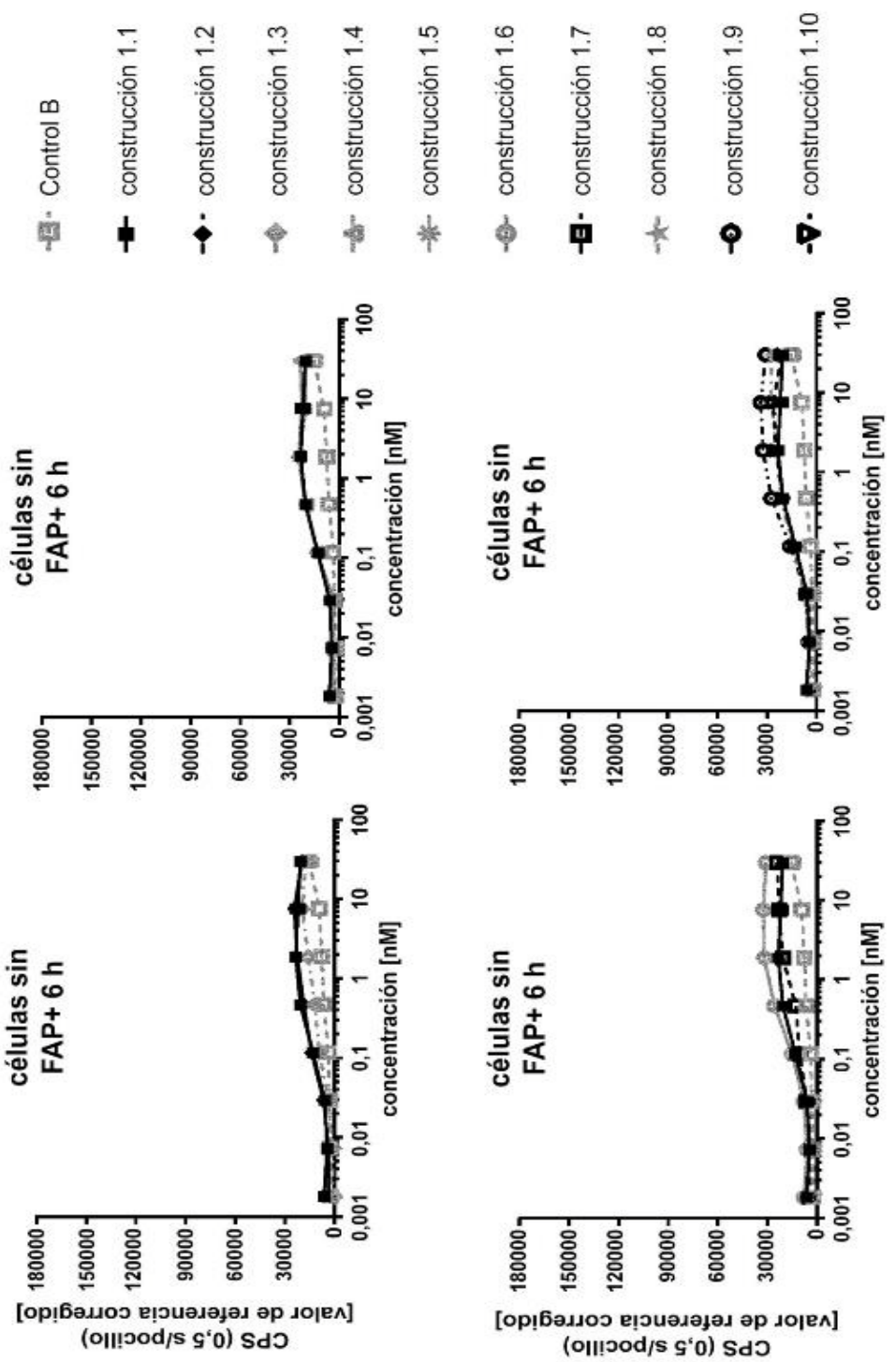

células sin FAP+ 6 h
células sin FAP+ 6 h
células sin FAP+ 6 h
células sin FAP+ 6 h
CPS (0,5 s/pocillo) [valor de referencia corregido]
concentración [nM]
0,001
0,01
0,1
1
10
100
0
30000
60000
90000
120000
150000
180000
Control B
construcción 1.1
construcción 1.2
construcción 1.3
construcción 1.4
construcción 1.5
construcción 1.6
construcción 1.7
construcción 1.8
construcción 1.9
construcción 1.10

Fig. 17B

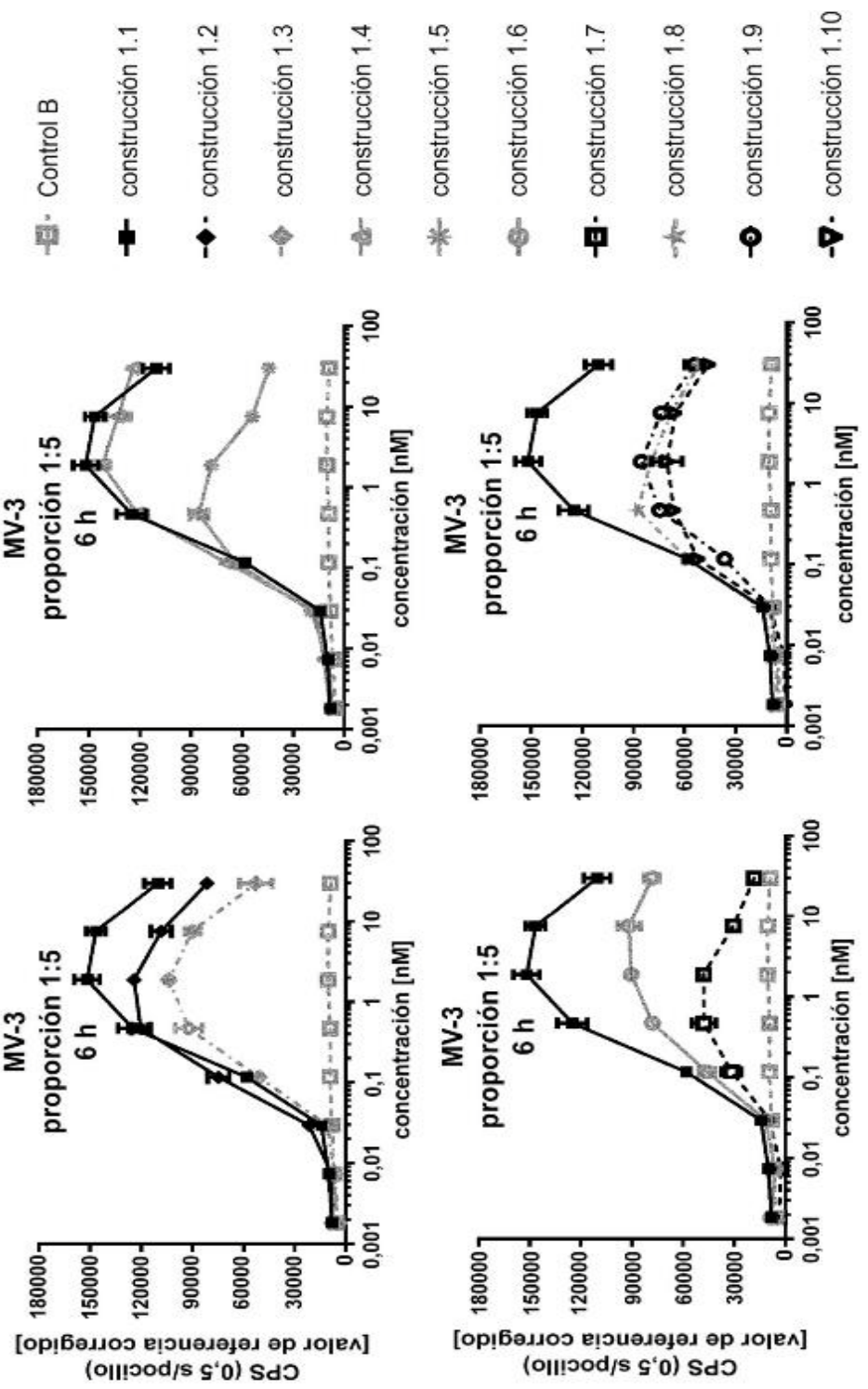

MV-3
proporción 1:5
6 h
CPS (0,5 s/pocillo)
[valor de referencia corregido]
concentración [nM]
0,001
0,01
0,1
1
10
100
0
30000
60000
90000
120000
150000
180000
Control B
construcción 1.1
construcción 1.2
construcción 1.3
construcción 1.4
construcción 1.5
construcción 1.6
construcción 1.7
construcción 1.8
construcción 1.9
construcción 1.10

Fig. 17C

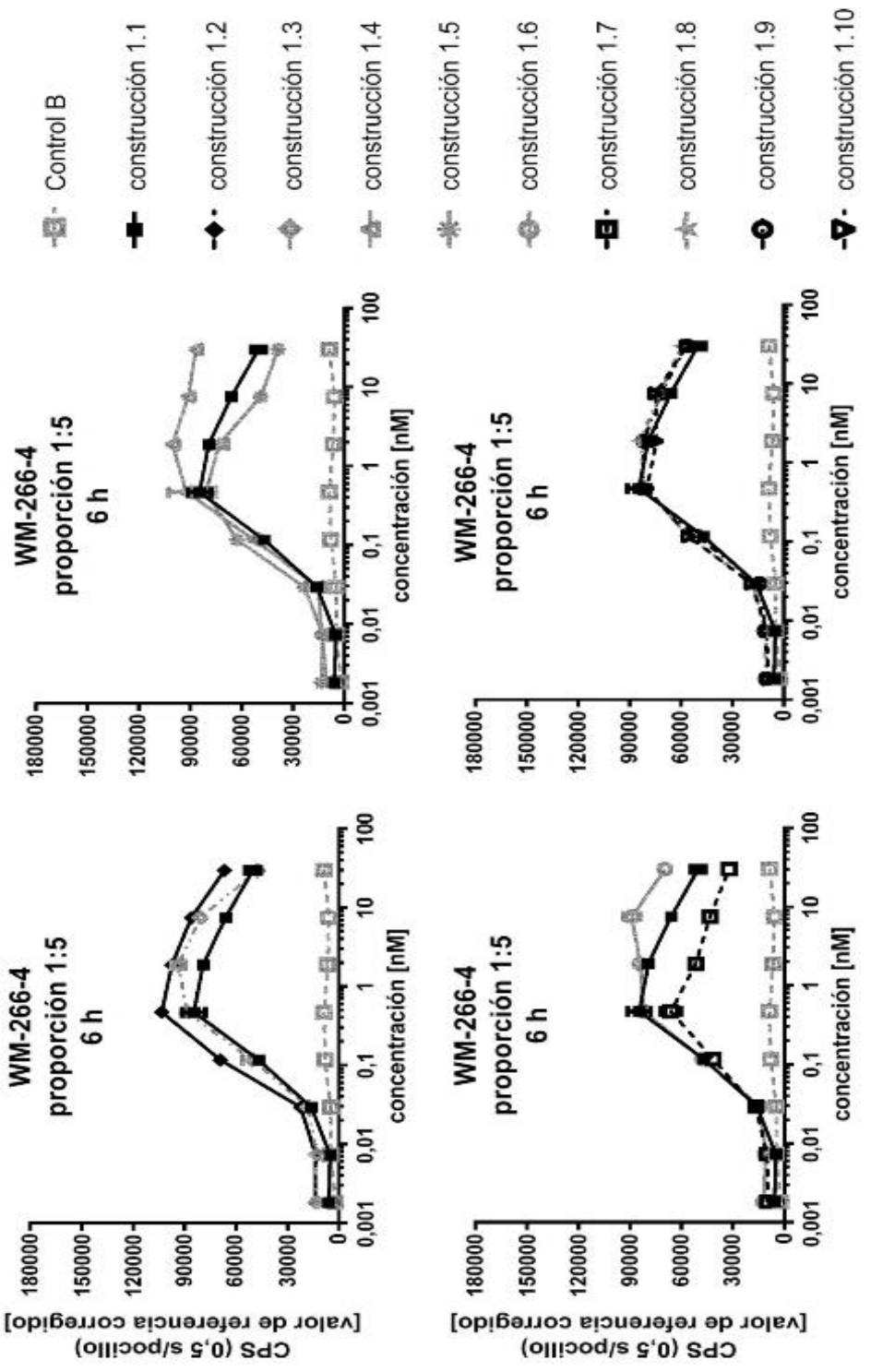

WM-266-4
proporción 1:5
6 h
CPS (0,5 s/pocillo)
[valor de referencia corregido]
concentración [nM]
0,001
0,01
0,1
1
10
100
0
30000
60000
90000
120000
150000
180000
Control B
construcción 1.1
construcción 1.2
construcción 1.3
construcción 1.4
construcción 1.5
construcción 1.6
construcción 1.7
construcción 1.8
construcción 1.9
construcción 1.10

Fig. 18

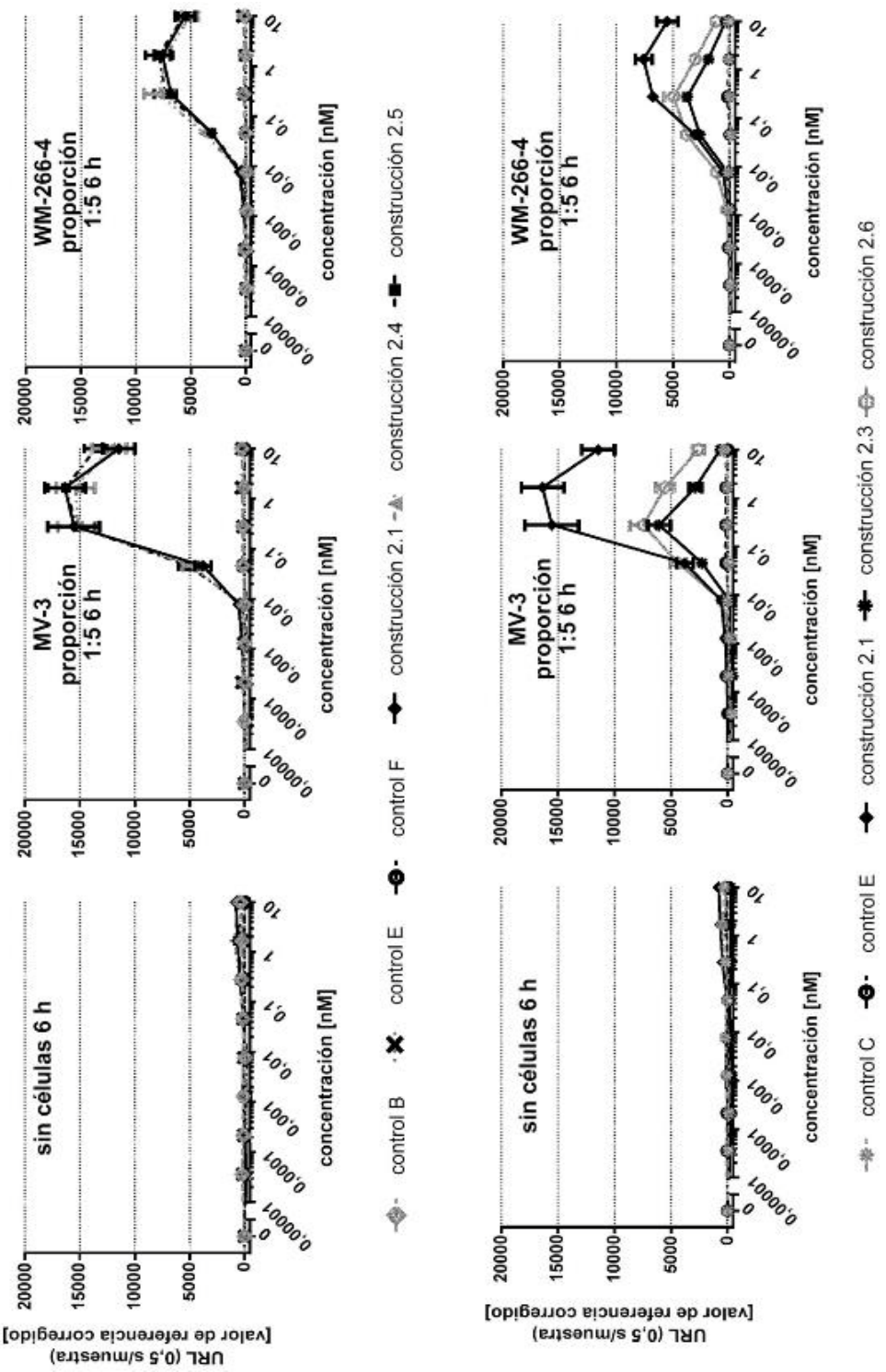

sin células 6 h
MV-3 proporción 1:5 6 h
WM-266-4 proporción 1:5 6 h
URL (0,5 s/muestra) [valor de referencia corregido]
concentración [nM]
control B
control E
control F
construcción 2.1
construcción 2.4
construcción 2.5
control C
control E
construcción 2.1
construcción 2.3
construcción 2.6

Fig. 19

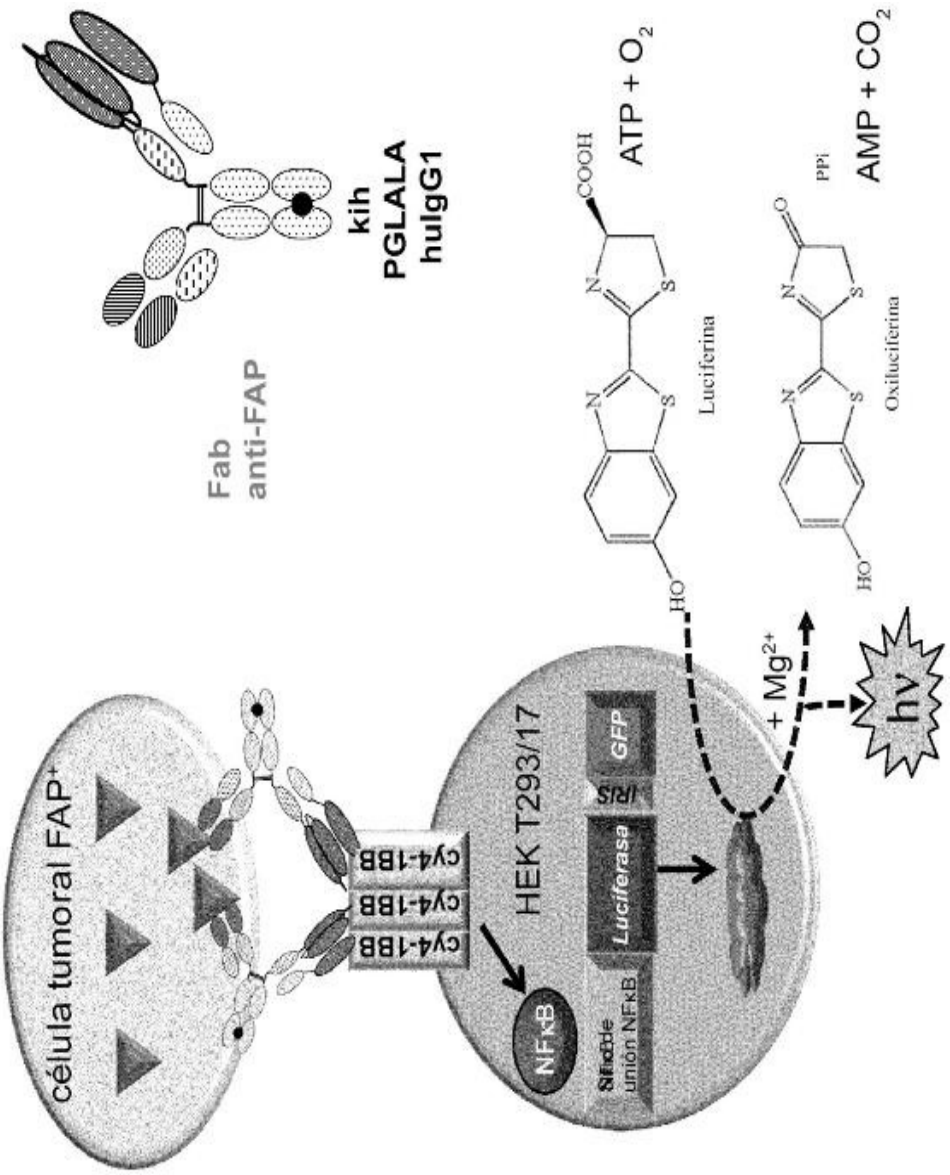
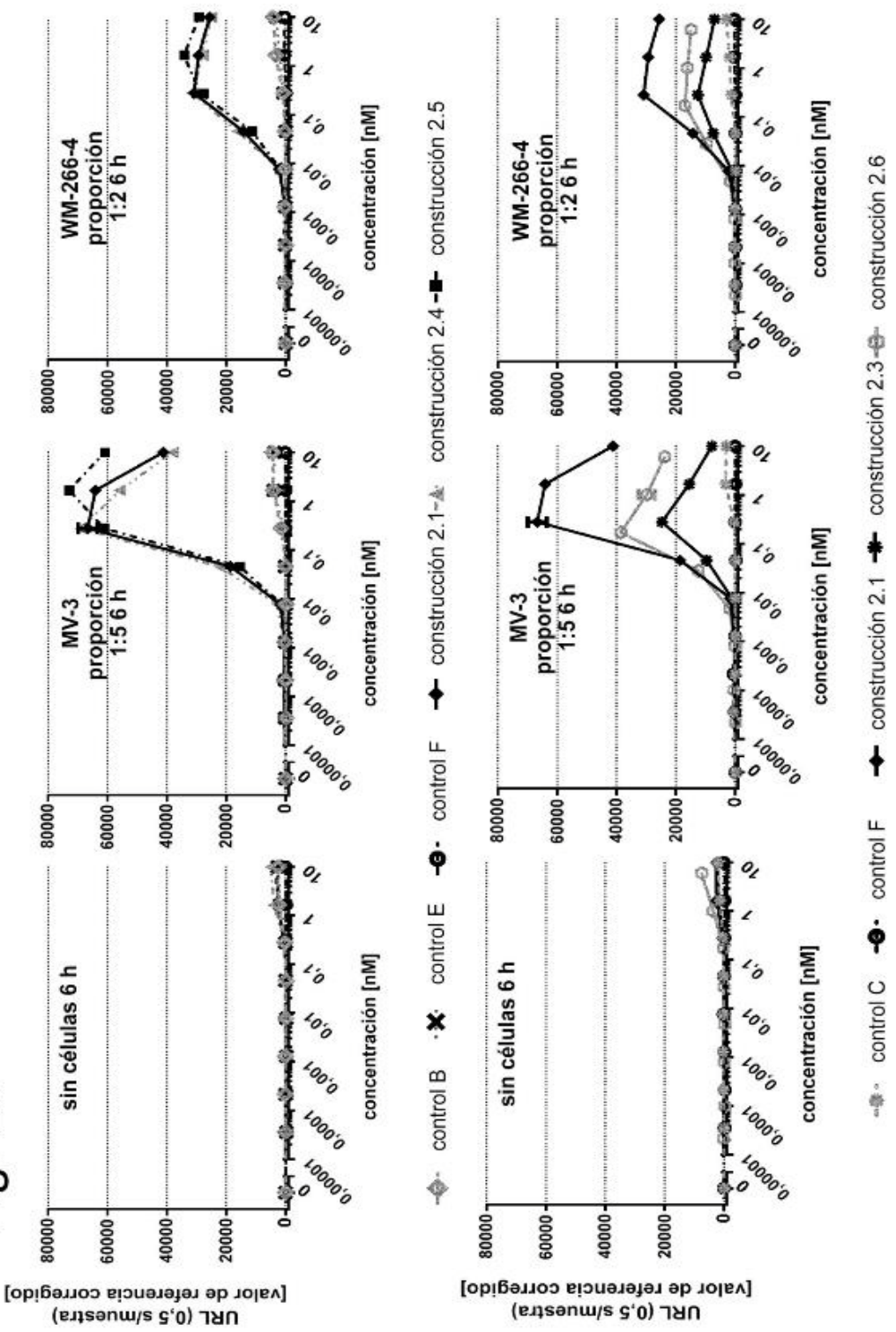

célula tumoral FAP+
cy4-1BB
cy4-1BB
cy4-1BB
HEK T293/17
NFκB
Sitio de unión NFκB
Luciferasa
IRES
GFP
Fab anti-FAP
kih PGLALA hulgG1
ATP + O2
Luciferina
AMP + CO2
PPi
Oxiluciferina
+ Mg2+
hν

Fig. 20


URL (0,5 s/muestra)
[valor de referencia corregido]
sin células 6 h
MV-3
proporción
1:5 6 h
WM-266-4
proporción
1:2 6 h
concentración [nM]
control B
control C
control E
control F
construcción 2.1
construcción 2.4
construcción 2.5
construcción 2.6

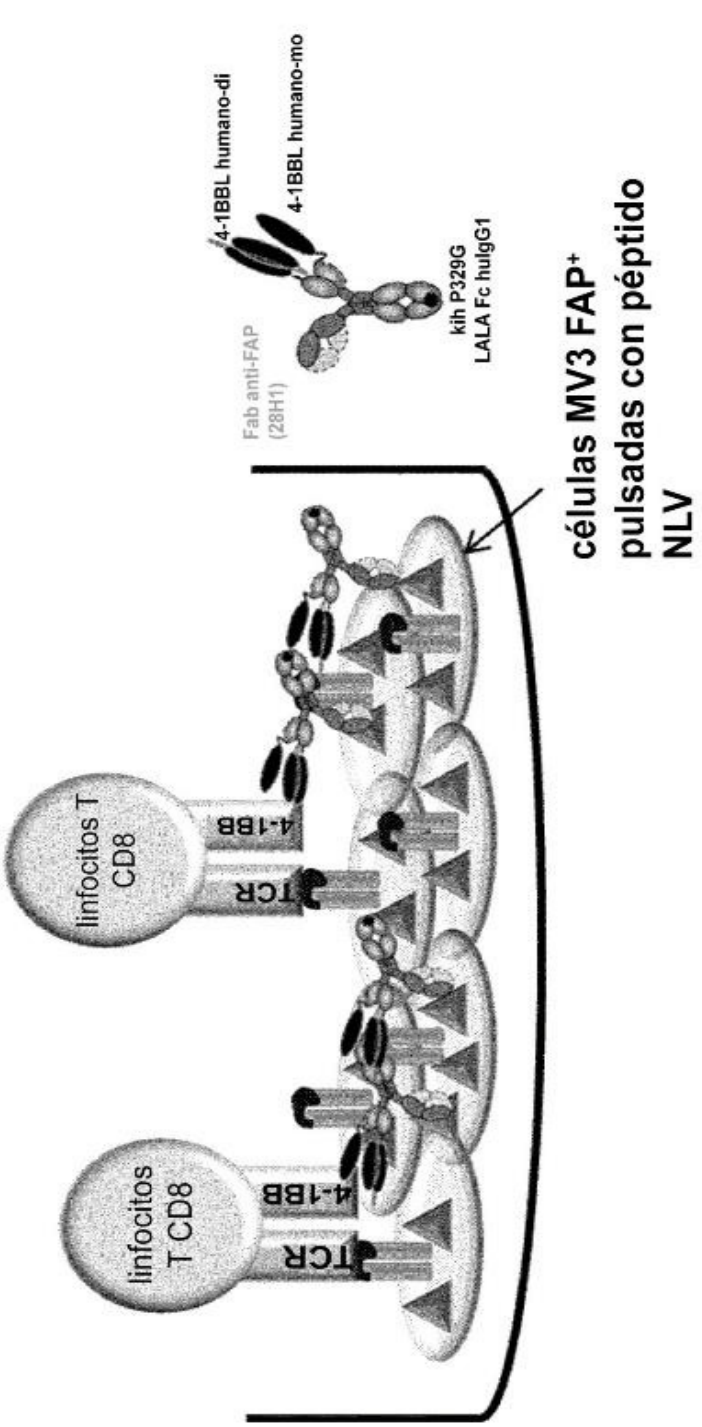

4-1BBL humano-di
4-1BBL humano-mo
Fab anti-FAP (28H1)
kih P329G LALA Fc hulgG1
células MV3 FAP+ pulsadas con péptido NLV
linfocitos T CD8
4-1BB
TCR
linfocitos T CD8
4-1BB
TCR

Fig. 21

Fig. 22

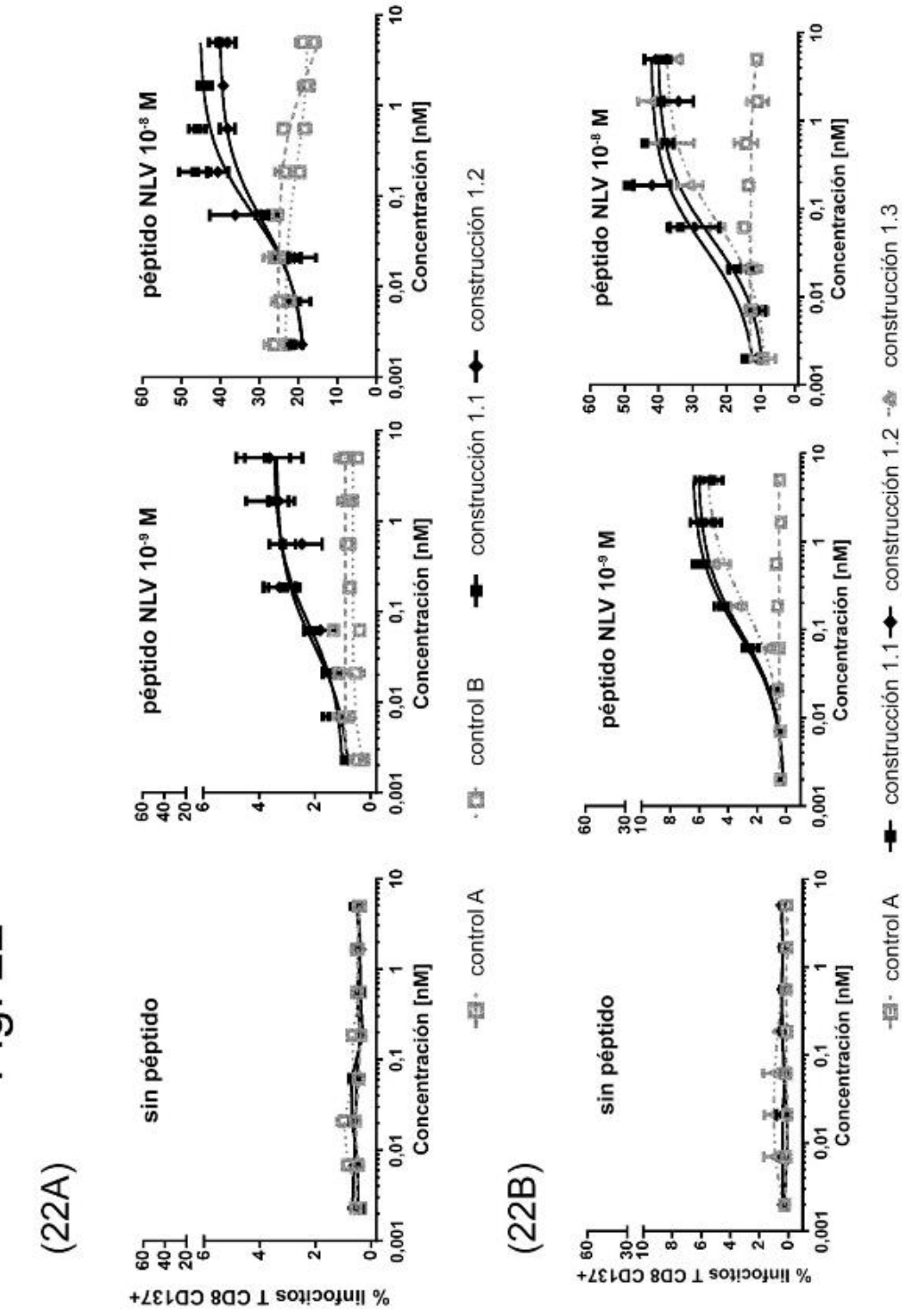

(22A)
sin péptido
péptido NLV 10-9 M
péptido NLV 10-8 M
% linfocitos T CD8 CD137+
Concentración [nM]
control A
control B
construcción 1.1
construcción 1.2
(22B)
sin péptido
péptido NLV 10-9 M
péptido NLV 10-8 M
% linfocitos T CD8 CD137+
Concentración [nM]
control A
construcción 1.1
construcción 1.2
construcción 1.3

Fig. 22

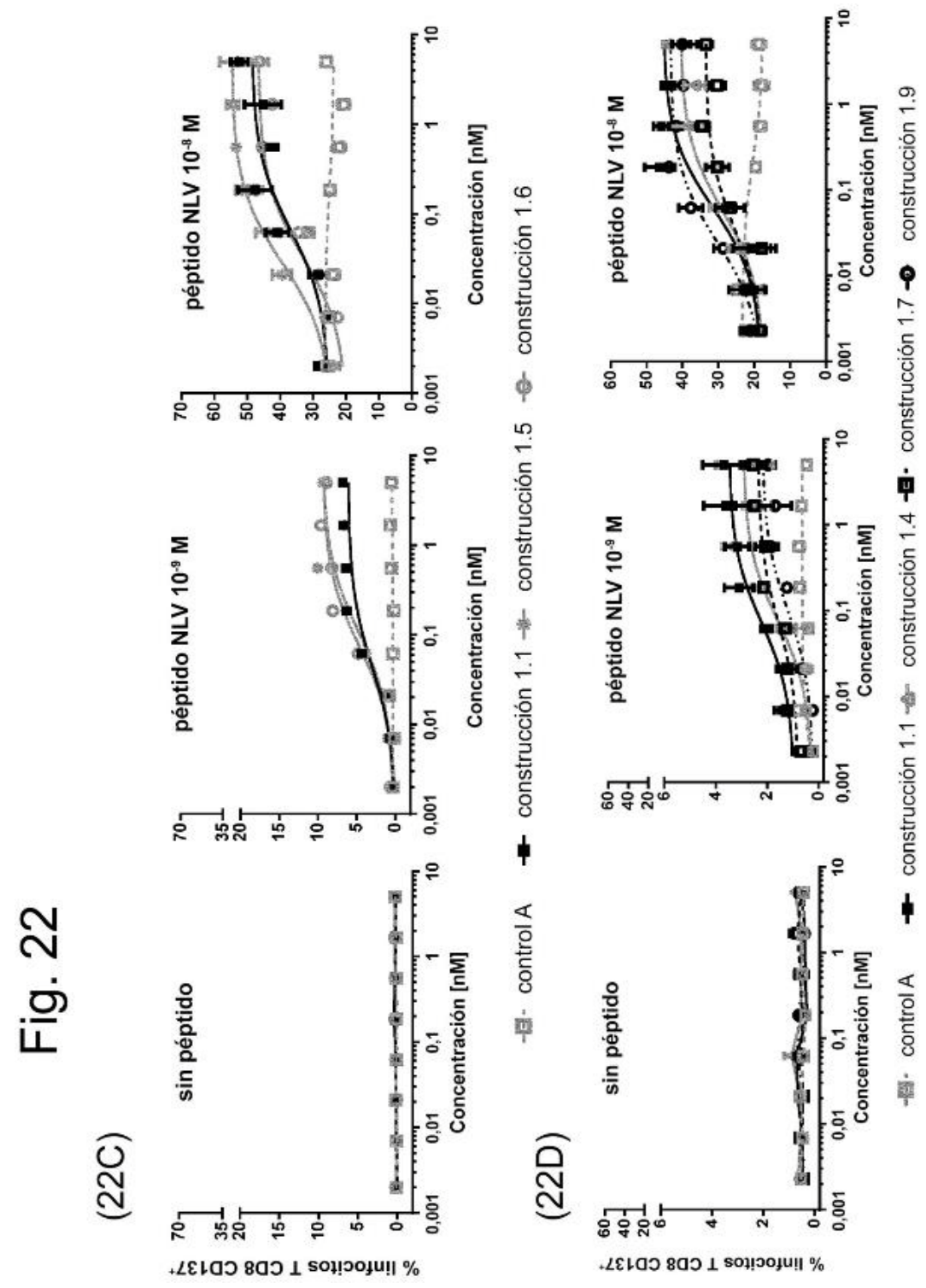

(22C)
sin péptido
péptido NLV 10⁻⁹ M
péptido NLV 10⁻⁸ M
% linfocitos T CD8 CD137+
Concentración [nM]
control A
construcción 1.1
construcción 1.5
construcción 1.6
(22D)
sin péptido
péptido NLV 10⁻⁹ M
péptido NLV 10⁻⁸ M
% linfocitos T CD8 CD137+
Concentración [nM]
control A
construcción 1.1
construcción 1.4
construcción 1.7
construcción 1.9

Fig. 22

(22E)

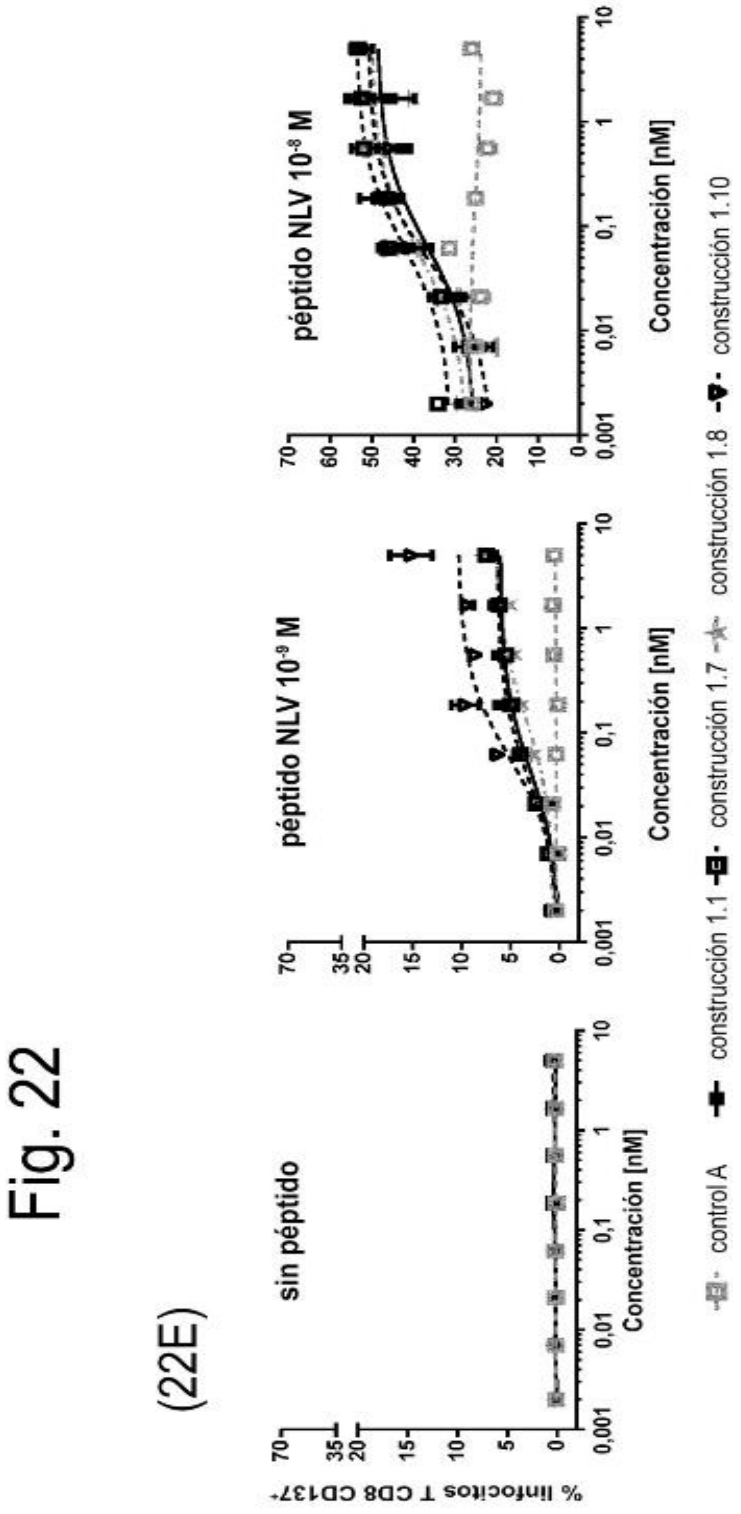

% linfocitos T CD8 CD137+
sin péptido
péptido NLV 10-9 M
péptido NLV 10-8 M
Concentración [nM]
control A
construcción 1.1
construcción 1.7
construcción 1.8
construcción 1.10

Fig. 23

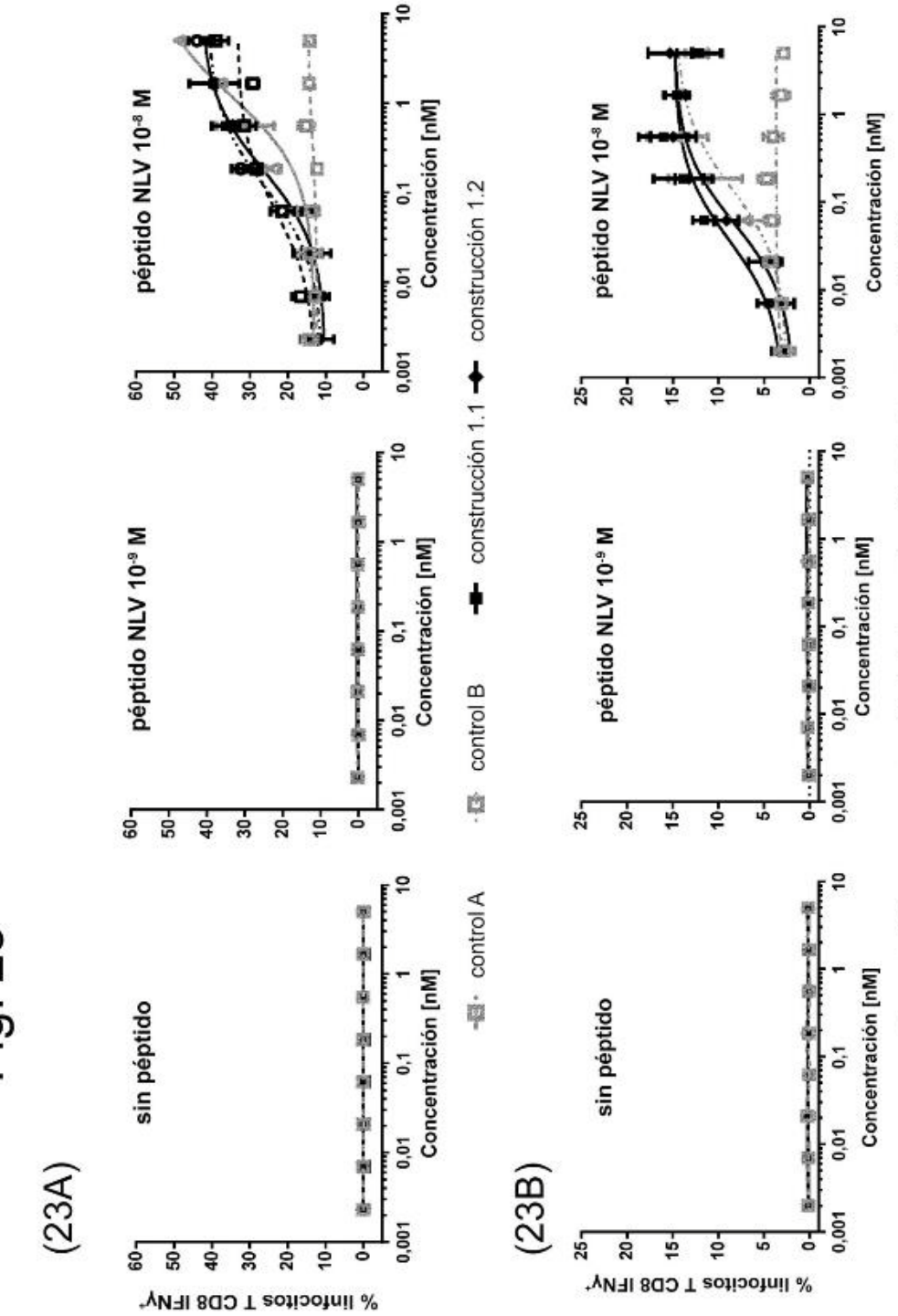

(23A)
sin péptido
péptido NLV 10-9 M
péptido NLV 10-8 M
% linfocitos T CD8 IFNγ+
Concentración [nM]
control A
control B
construcción 1.1
construcción 1.2
(23B)
sin péptido
péptido NLV 10-9 M
péptido NLV 10-8 M
% linfocitos T CD8 IFNγ+
Concentración [nM]
control A
construcción 1.1
construcción 1.2
construcción 1.3

Fig. 23

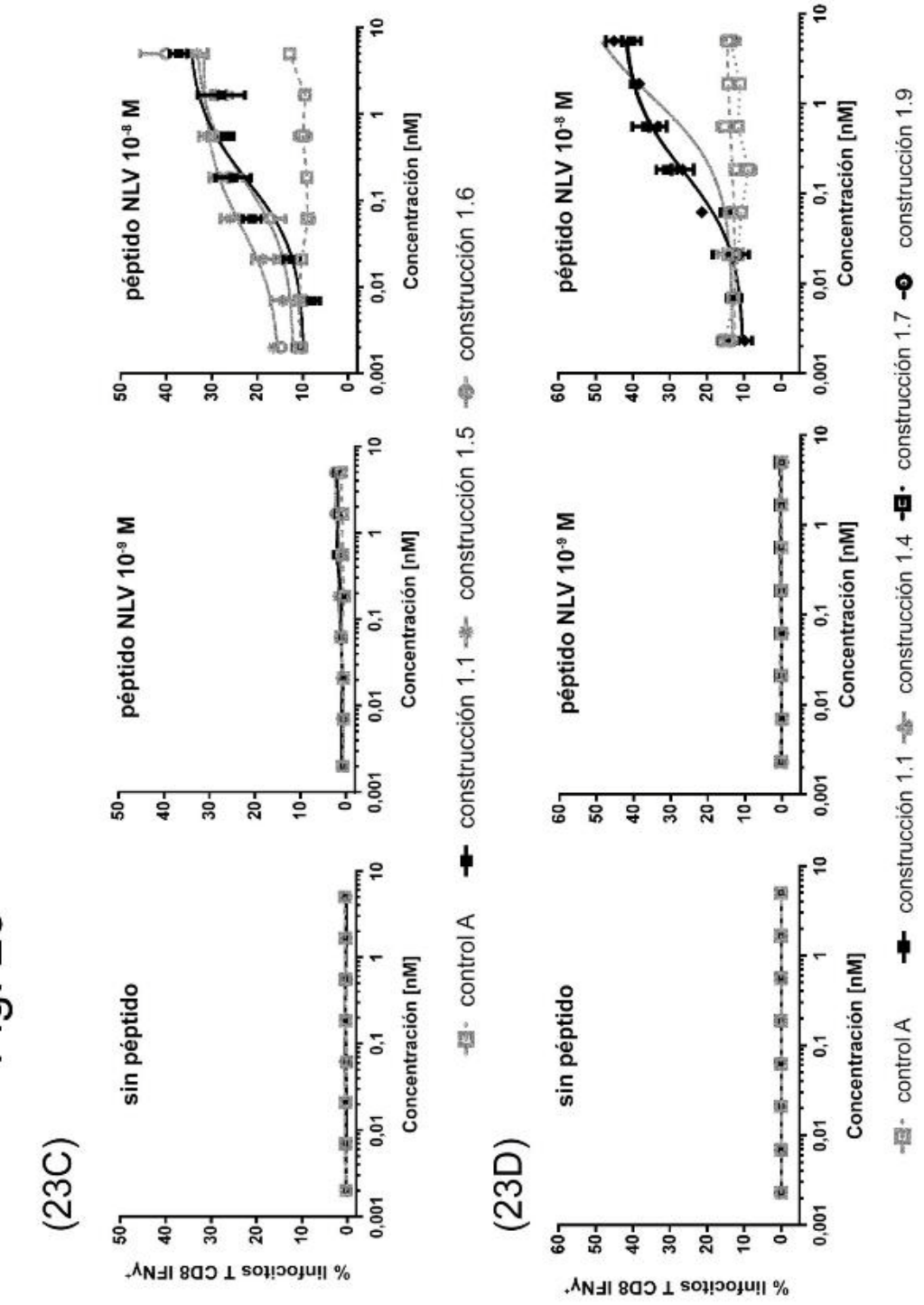

(23C)
sin péptido
péptido NLV 10-9 M
péptido NLV 10-8 M
% linfocitos T CD8 IFNγ+
Concentración [nM]
control A
construcción 1.1
construcción 1.5
construcción 1.6
(23D)
sin péptido
péptido NLV 10-9 M
péptido NLV 10-8 M
% linfocitos T CD8 IFNγ+
Concentración [nM]
control A
construcción 1.1
construcción 1.4
construcción 1.7
construcción 1.9

Fig. 23

(23E)

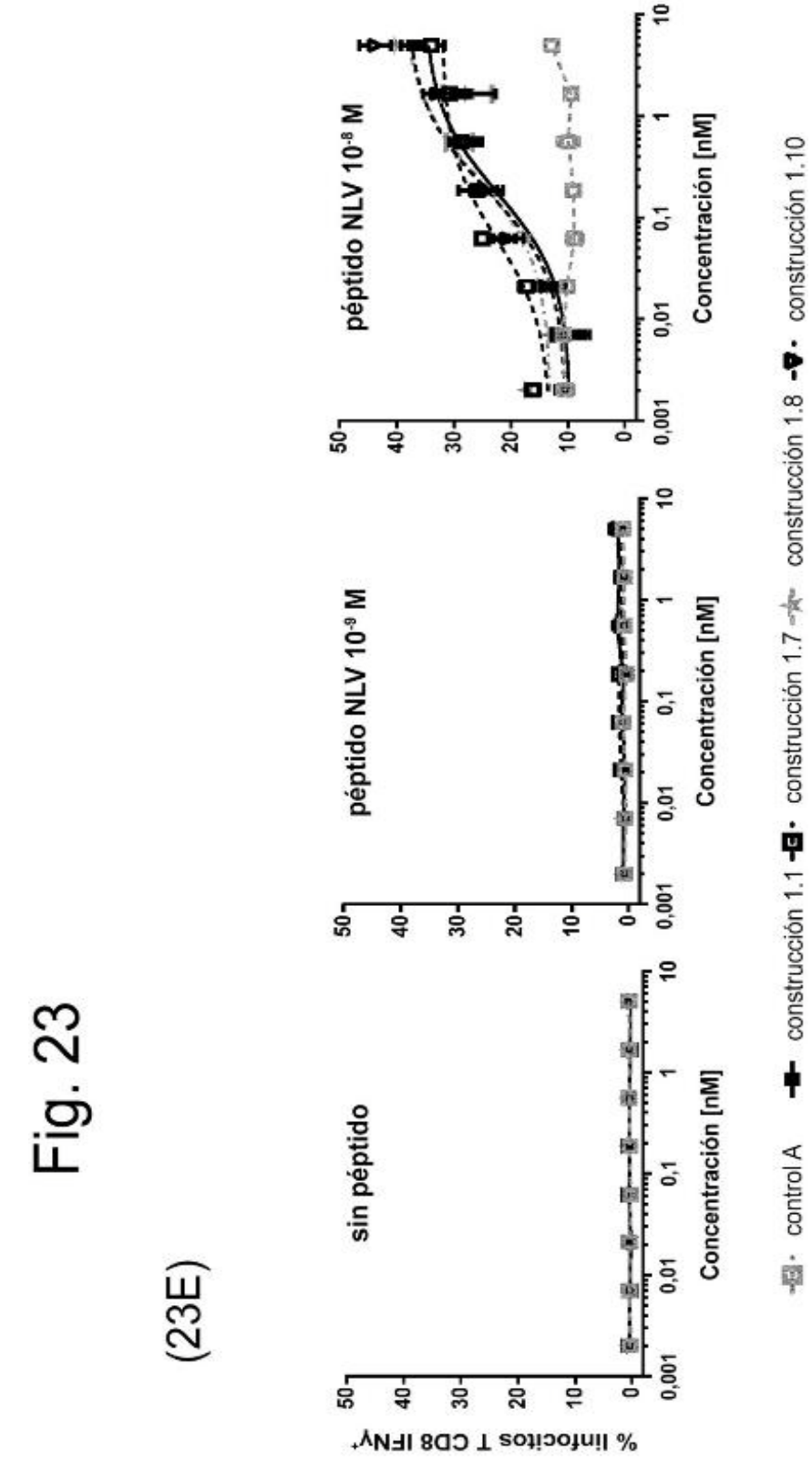

% linfocitos T CD8 IFNγ+
sin péptido
péptido NLV 10-9 M
péptido NLV 10-8 M
Concentración [nM]
control A
construcción 1.1
construcción 1.7
construcción 1.8
construcción 1.10

Fig. 24

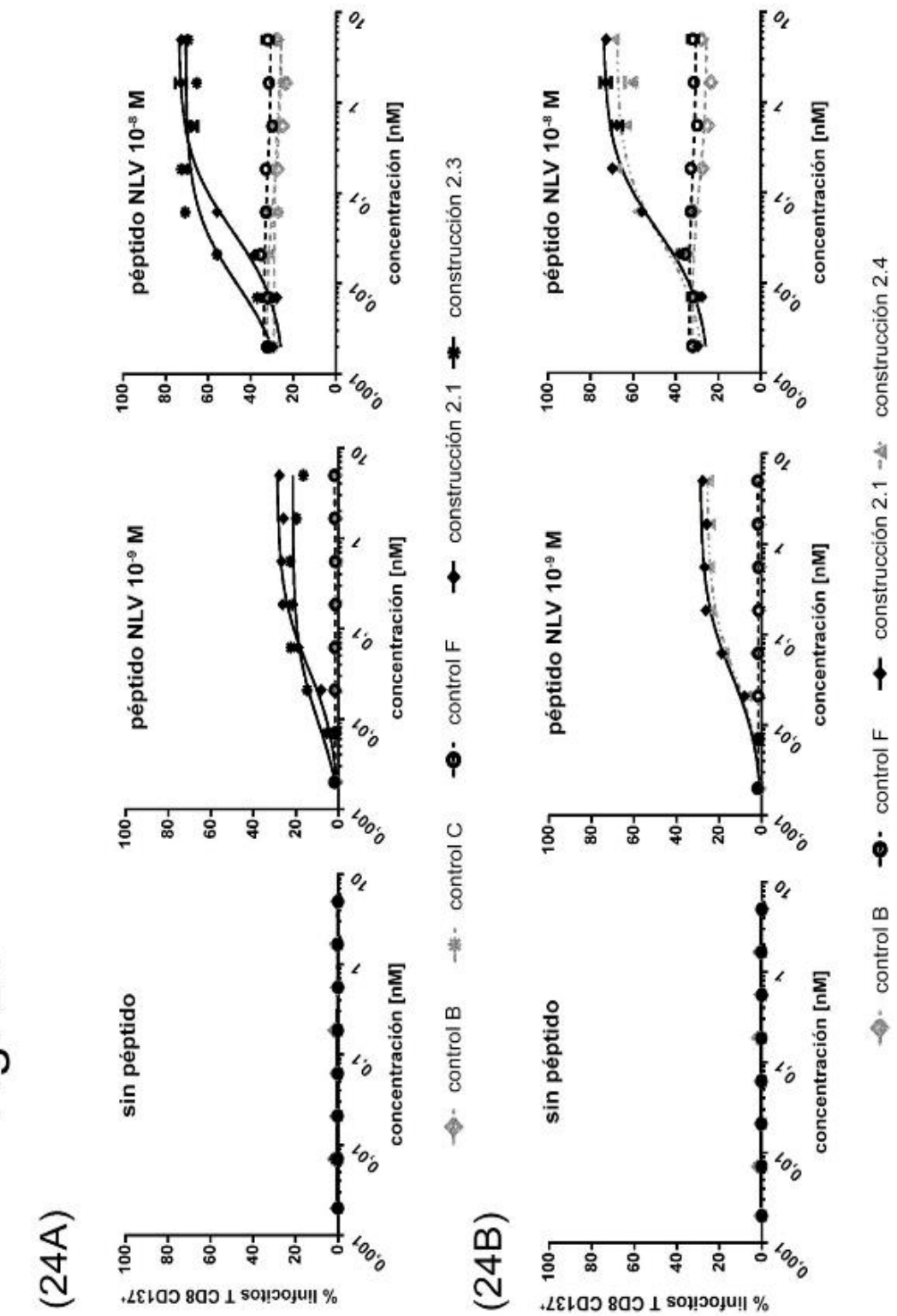
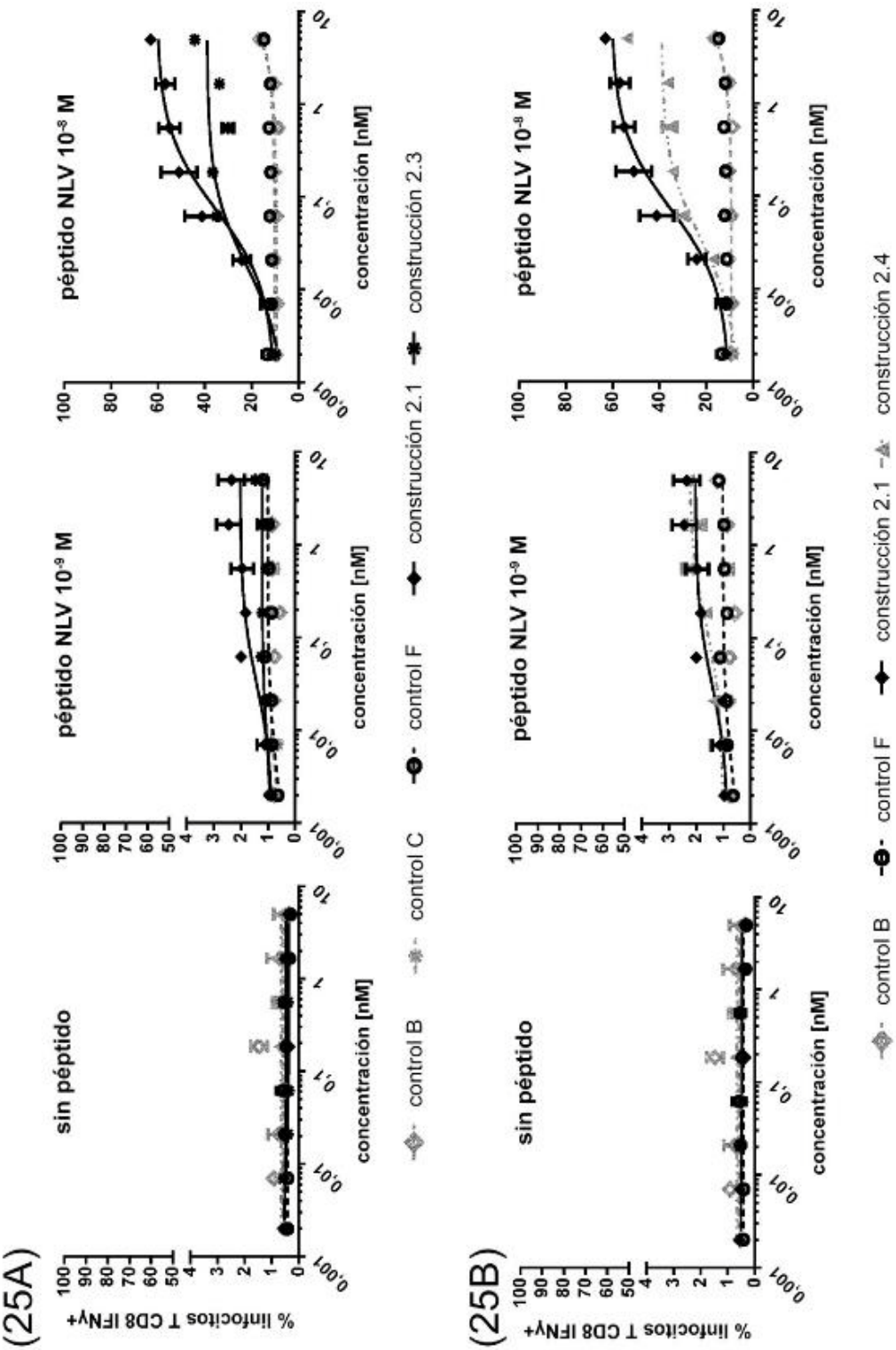

(24A)
sin péptido
péptido NLV 10-9 M
péptido NLV 10-8 M
% linfocitos T CD8 CD137+
concentración [nM]
control B
control C
control F
construcción 2.1
construcción 2.3
(24B)
sin péptido
péptido NLV 10-9 M
péptido NLV 10-8 M
% linfocitos T CD8 CD137+
concentración [nM]
control B
control F
construcción 2.1
construcción 2.4

Fig. 25


(25A)
sin péptido
péptido NLV 10⁻⁹ M
péptido NLV 10⁻⁸ M
% linfocitos T CD8 IFNγ+
concentración [nM]
control B
control C
control F
construcción 2.1
construcción 2.3
(25B)
sin péptido
péptido NLV 10⁻⁹ M
péptido NLV 10⁻⁸ M
% linfocitos T CD8 IFNγ+
concentración [nM]
control B
control F
construcción 2.1
construcción 2.4

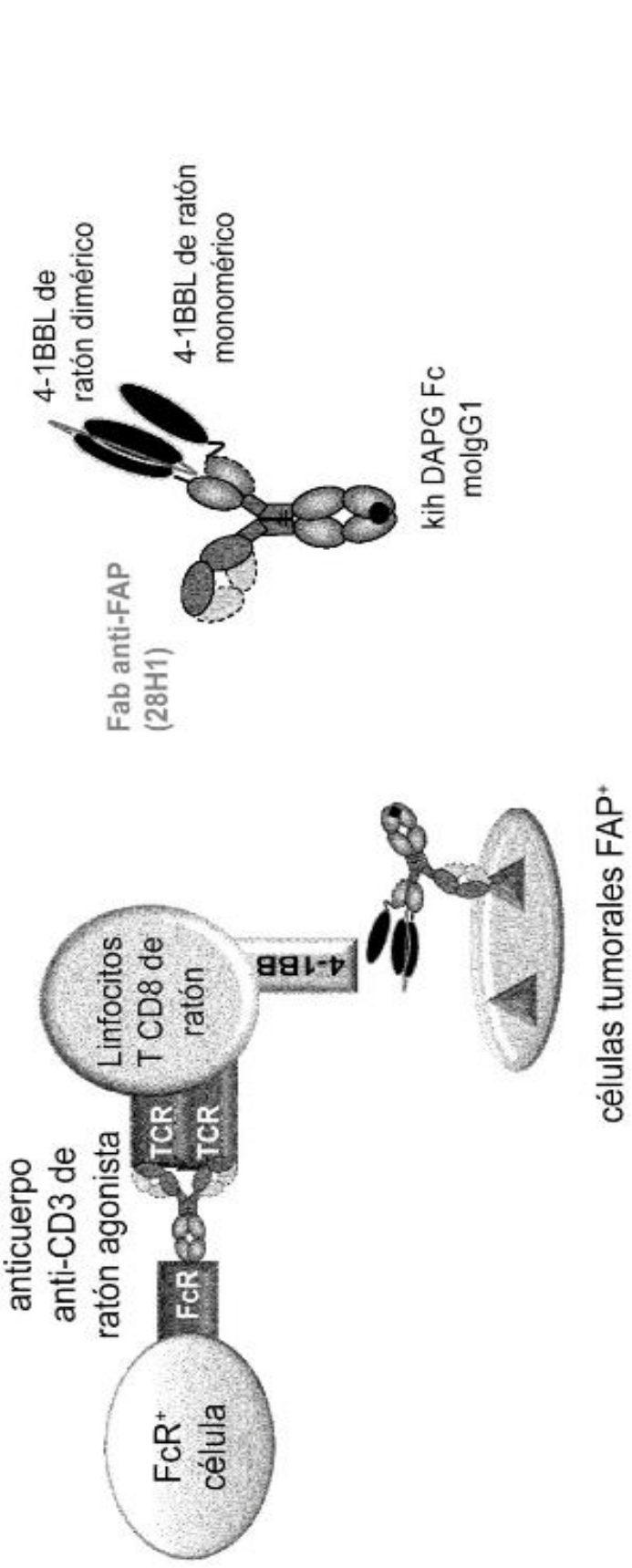

4-1BBL de ratón dimérico
4-1BBL de ratón monomérico
kih DAPG Fc molgG1
Fab anti-FAP (28H1)
anticuerpo anti-CD3 de ratón agonista
Linfocitos T CD8 de ratón
TCR
TCR
FcR
4-1BB
FcR+ célula
células tumorales FAP+

Fig. 26

Fig. 27

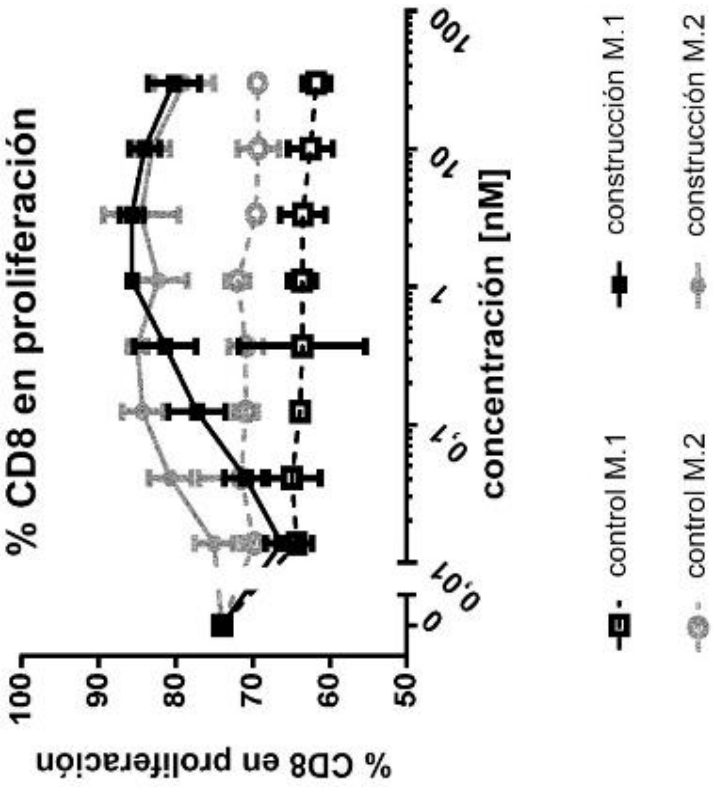

% CD8 en proliferación
100
90
80
70
60
50
0
0,01
0,1
1
10
100
concentración [nM]
control M.1
construcción M.1
control M.2
construcción M.2

Fig. 28A

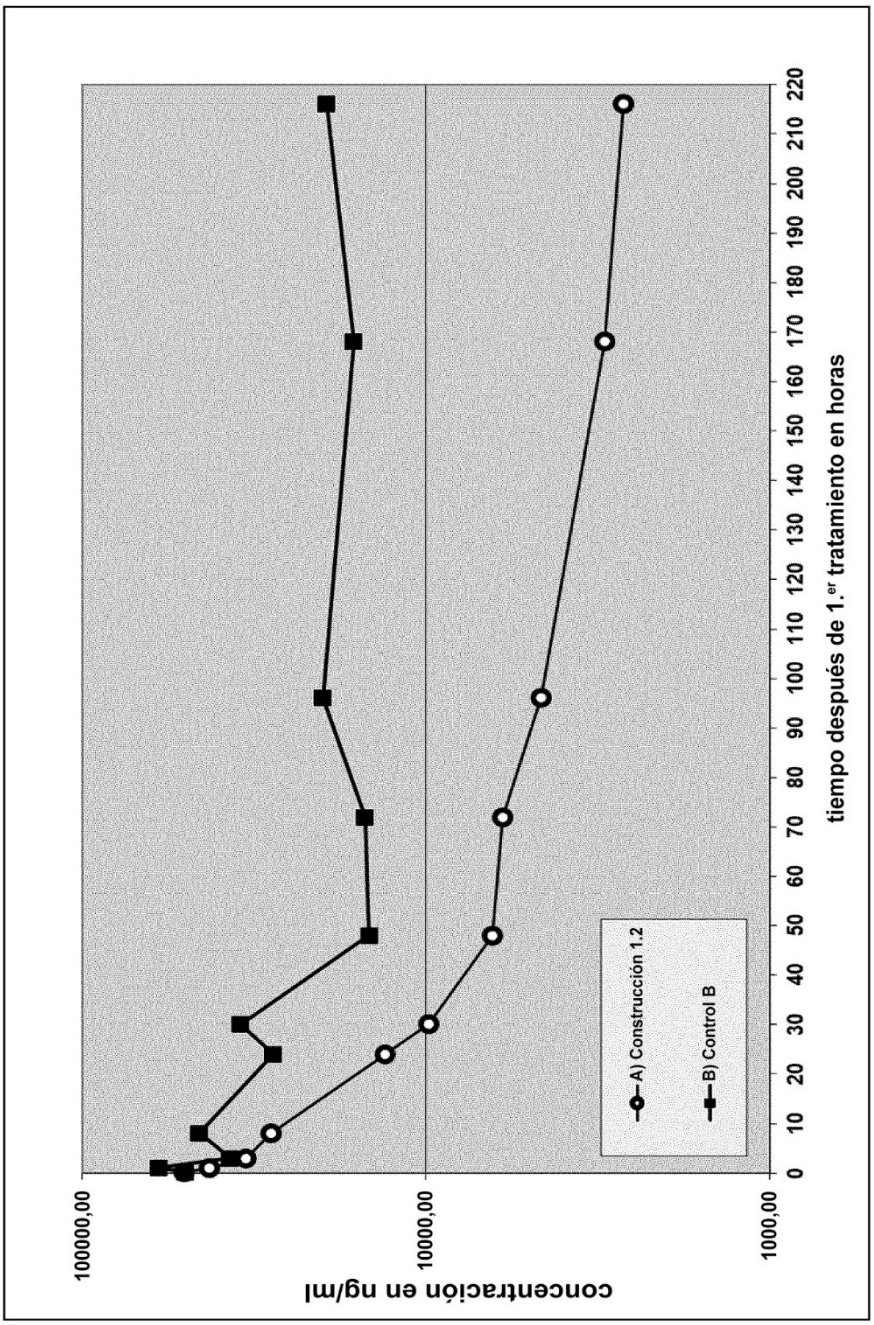

concentración en ng/ml
100000,00
10000,00
1000,00
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220
tiempo después de 1.er tratamiento en horas
A) Construcción 1.2
B) Control B

Fig. 28B

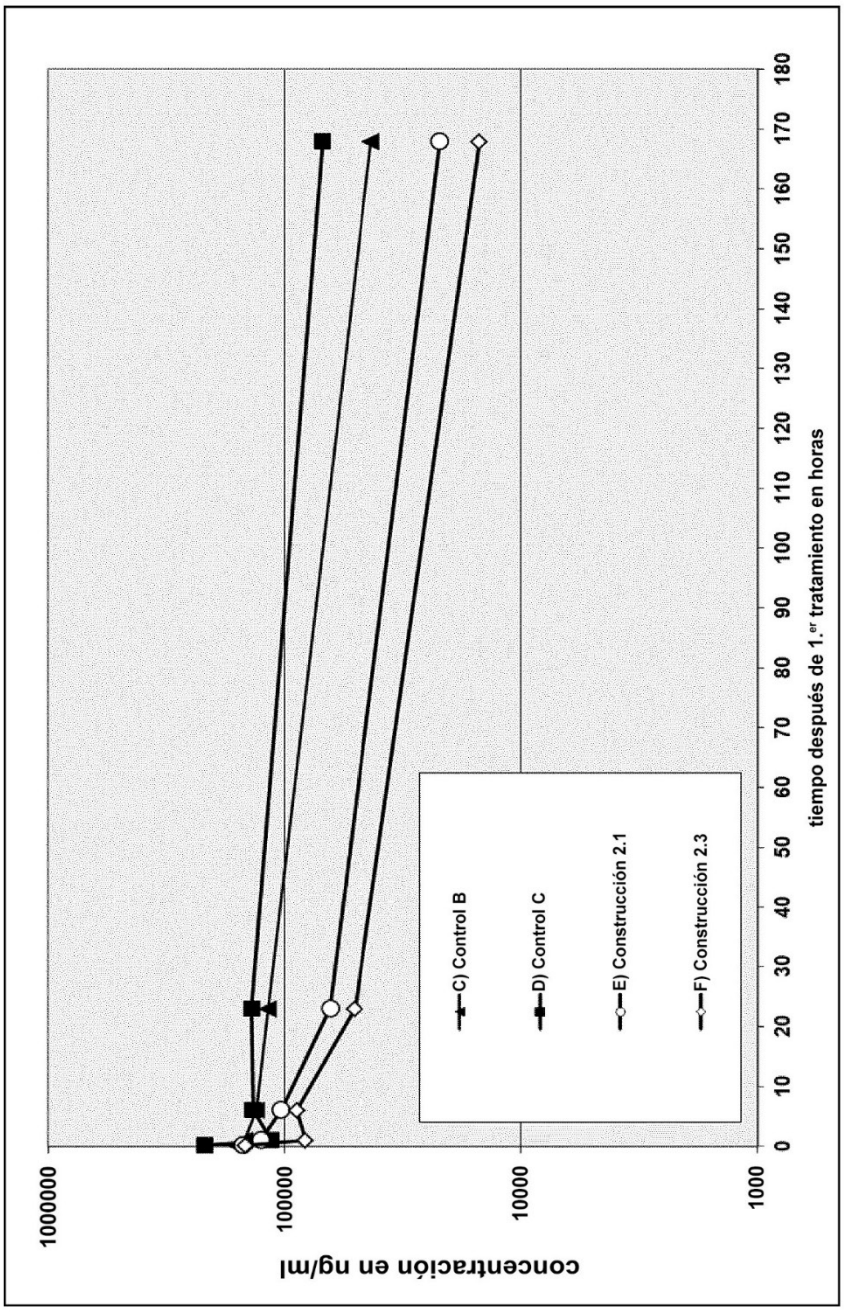

concentración en ng/ml
1000000
100000
10000
1000
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
tiempo después de 1.er tratamiento en horas
C) Control B
D) Control C
E) Construcción 2.1
F) Construcción 2.3

Fig. 28C

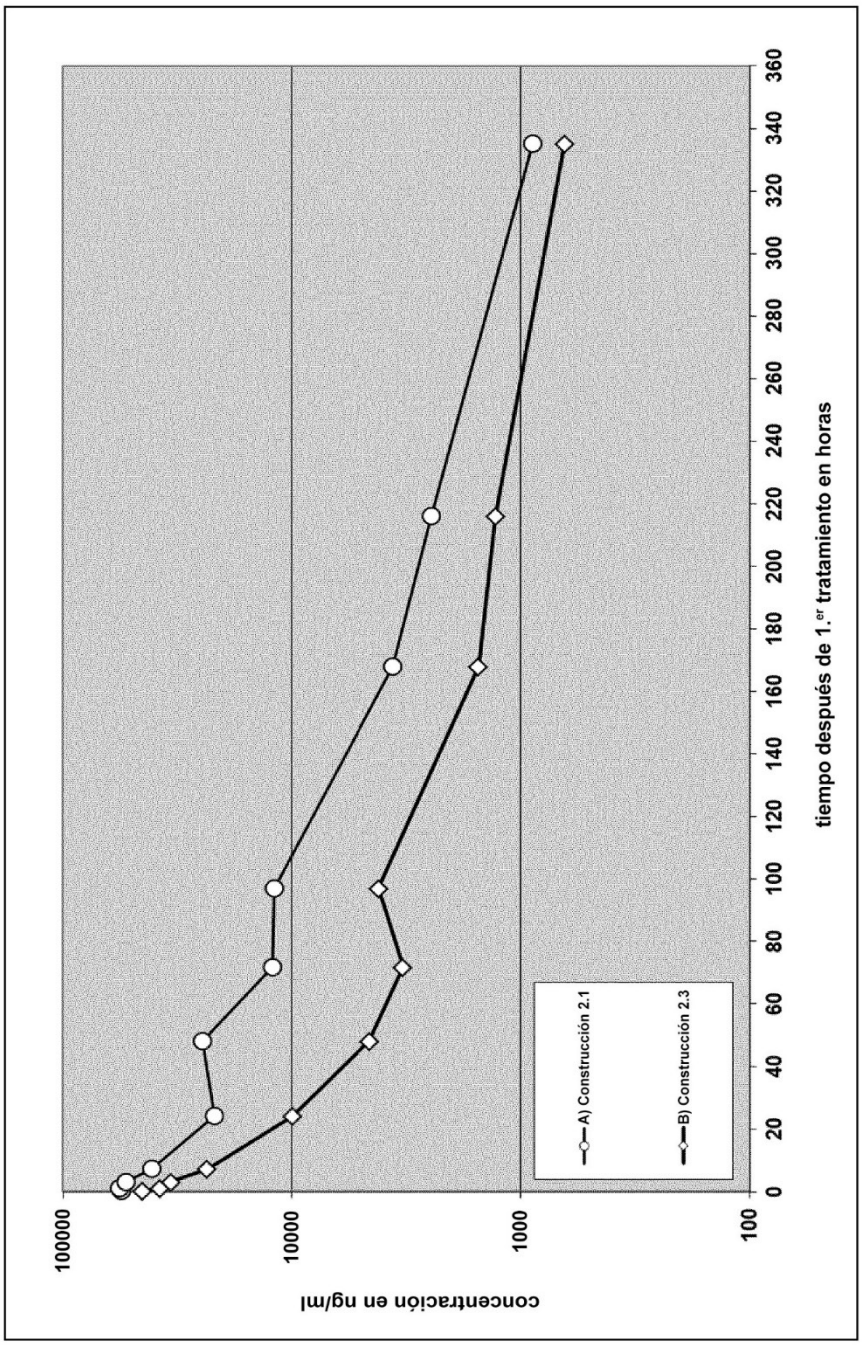

concentración en ng/ml
100000
10000
1000
100
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260
280
300
320
340
360
tiempo después de 1.er tratamiento en horas
A) Construcción 2.1
B) Construcción 2.3

Fig. 29

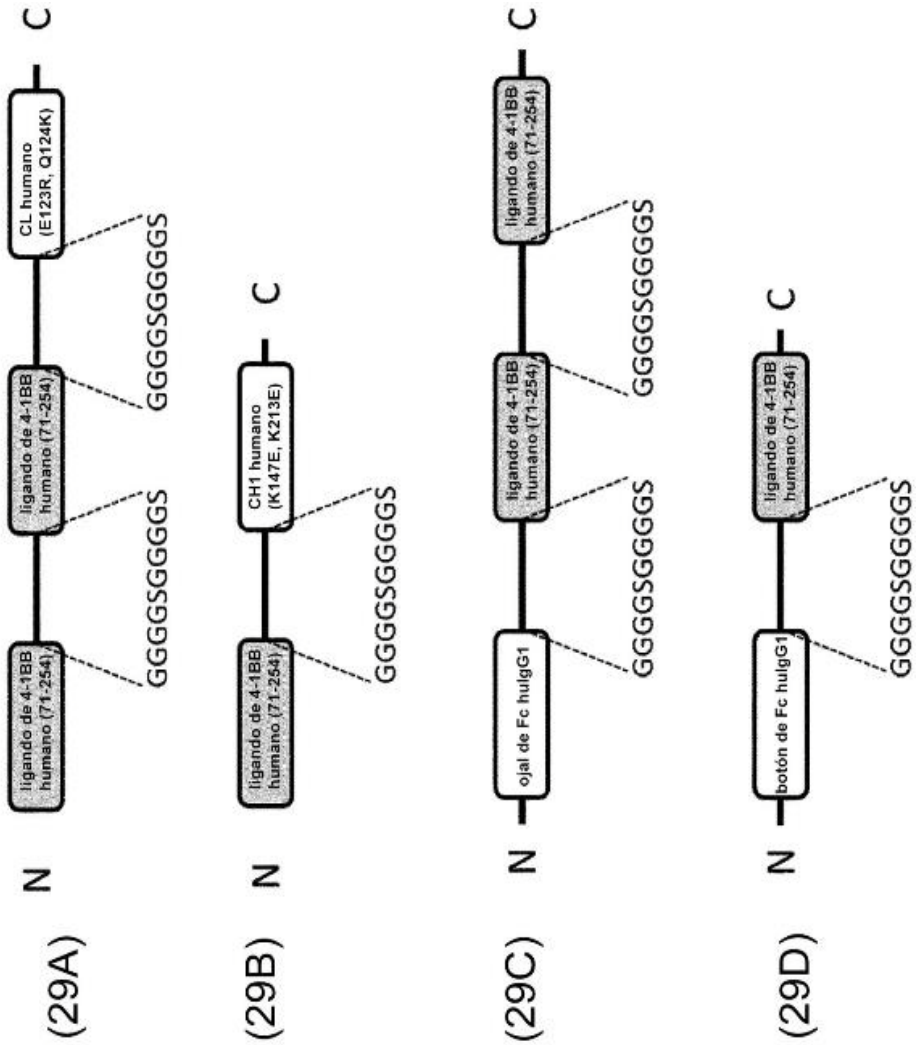

(29A)
N
ligando de 4-1BB humano (71-254)
GGGGSGGGGS
ligando de 4-1BB humano (71-254)
GGGGSGGGGS
CL humano (E123R, Q124K)
C
(29B)
N
ligando de 4-1BB humano (71-254)
GGGGSGGGGS
CH1 humano (K147E, K213E)
C
(29C)
N
ojal de Fc hulgG1
GGGGSGGGGS
ligando de 4-1BB humano (71-254)
GGGGSGGGGS
ligando de 4-1BB humano (71-254)
C
(29D)
N
botón de Fc hulgG1
GGGGSGGGGS
ligando de 4-1BB humano (71-254)
C

Fig. 30

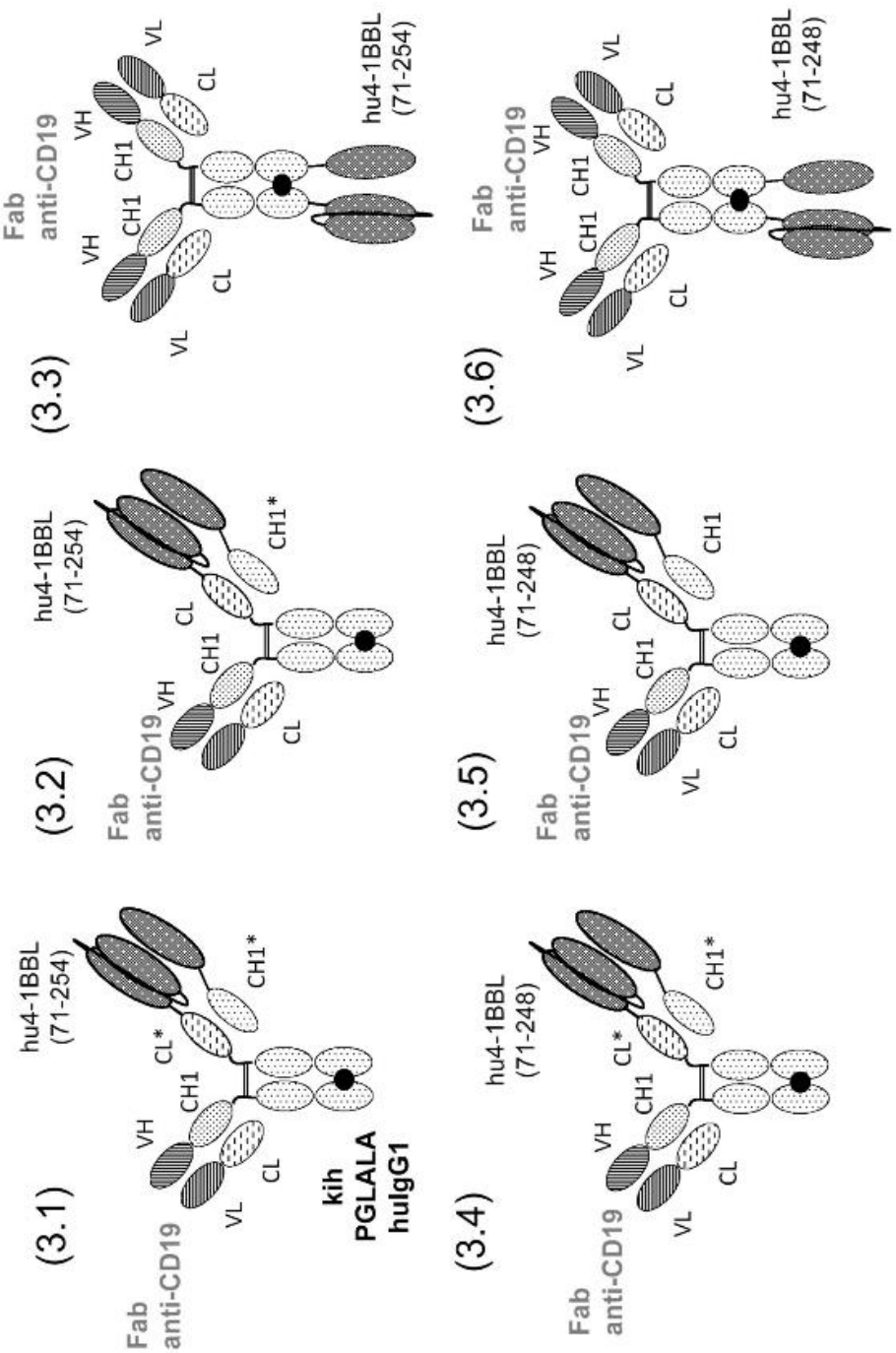

(3.1)
hu4-1BBL (71-254)
CL*
CH1*
VH
CH1
CL
VL
Fab anti-CD19
kih PGLALA hulgG1
(3.2)
hu4-1BBL (71-254)
CH1*
CL
CH1
VH
CL
Fab anti-CD19
(3.3)
Fab anti-CD19
VH
VL
CH1
CL
CH1
VH
VL
CL
hu4-1BBL (71-254)
(3.4)
hu4-1BBL (71-248)
CL*
CH1*
VH
CH1
CL
VL
Fab anti-CD19
(3.5)
hu4-1BBL (71-248)
CH1
CL
CH1
VH
CL
VL
Fab anti-CD19
(3.6)
Fab anti-CD19
VH
VL
CH1
CL
CH1
VH
VL
CL
hu4-1BBL (71-248)

Fig. 31A

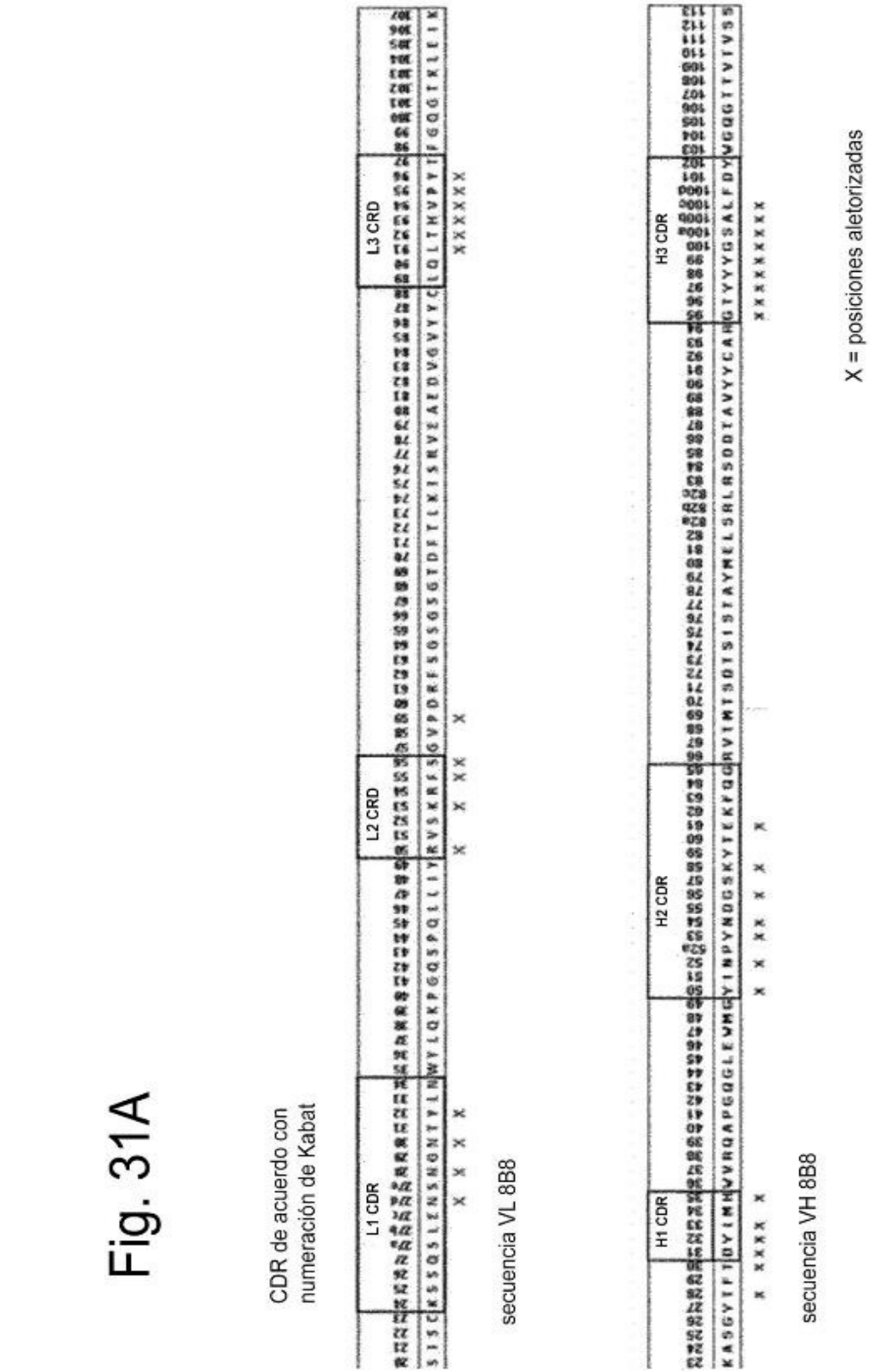

CDR de acuerdo con numeración de Kabat
L1 CDR
L2 CRD
L3 CRD
secuencia VL 8B8
H1 CDR
H2 CDR
H3 CDR
secuencia VH 8B8
X = posiciones aletorizadas

Fig. 31B

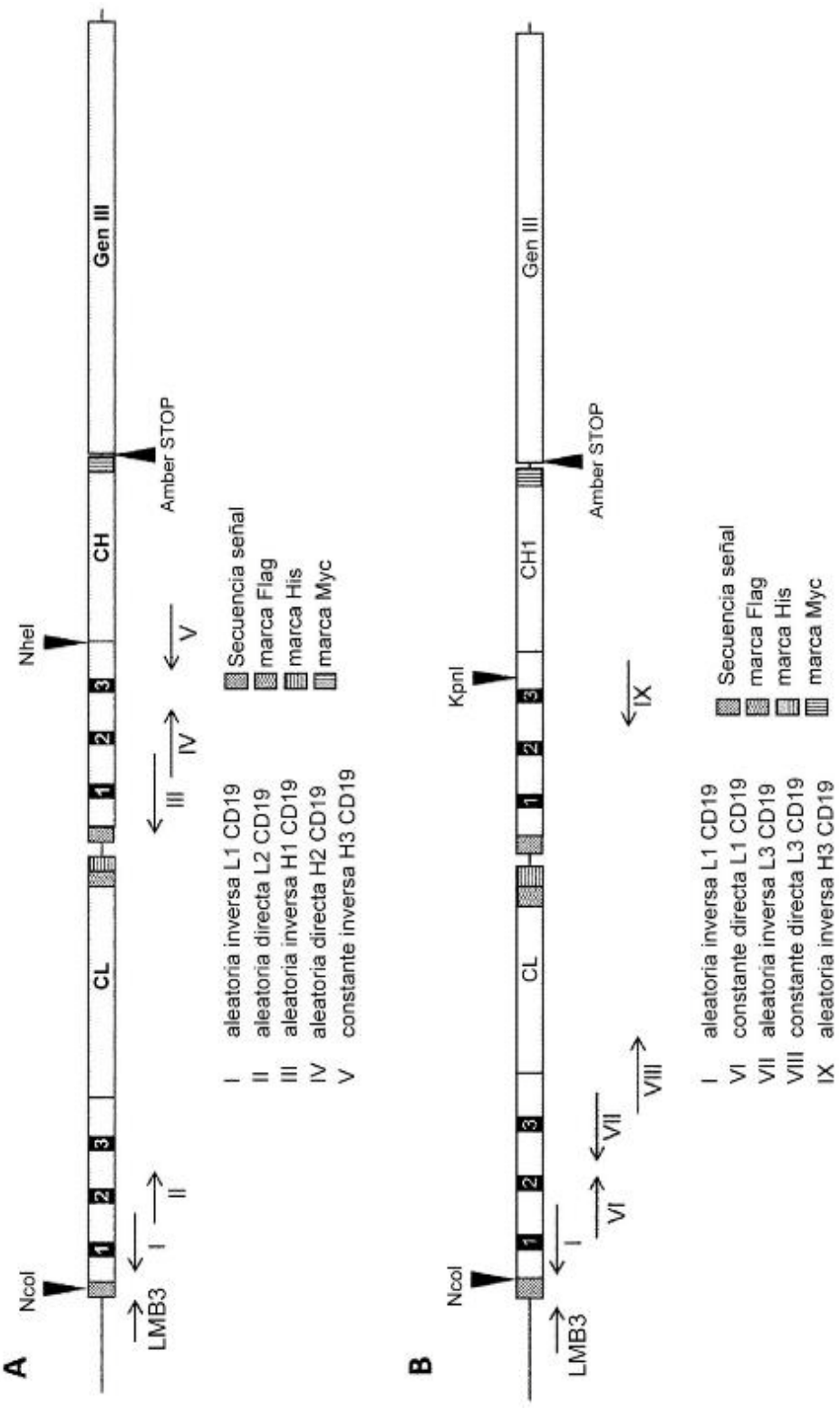

A
NcoI
NheI
CL
CH
Gen III
Amber STOP
LMB3
I
II
III
IV
V
1
2
3
I aleatoria inversa L1 CD19
II aleatoria directa L2 CD19
III aleatoria inversa H1 CD19
IV aleatoria directa H2 CD19
V constante inversa H3 CD19
Secuencia señal
marca Flag
marca His
marca Myc
B
NcoI
KpnI
CL
CH1
Gen III
Amber STOP
LMB3
I
VI
VII
VIII
IX
I aleatoria inversa L1 CD19
VI constante directa L1 CD19
VII aleatoria inversa L3 CD19
VIII constante directa L3 CD19
IX aleatoria inversa H3 CD19
Secuencia señal
marca Flag
marca His
marca Myc

Fig. 32

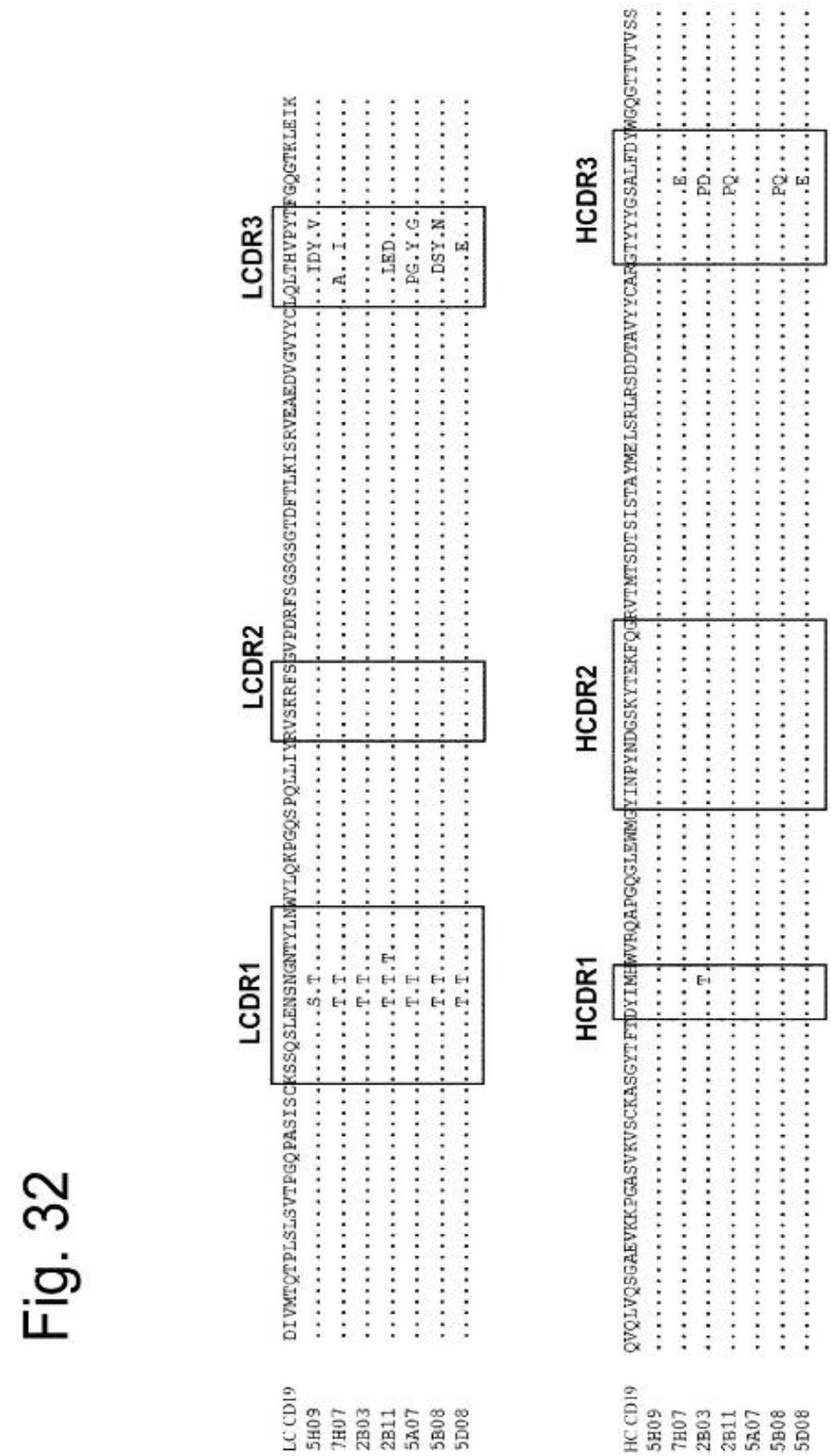
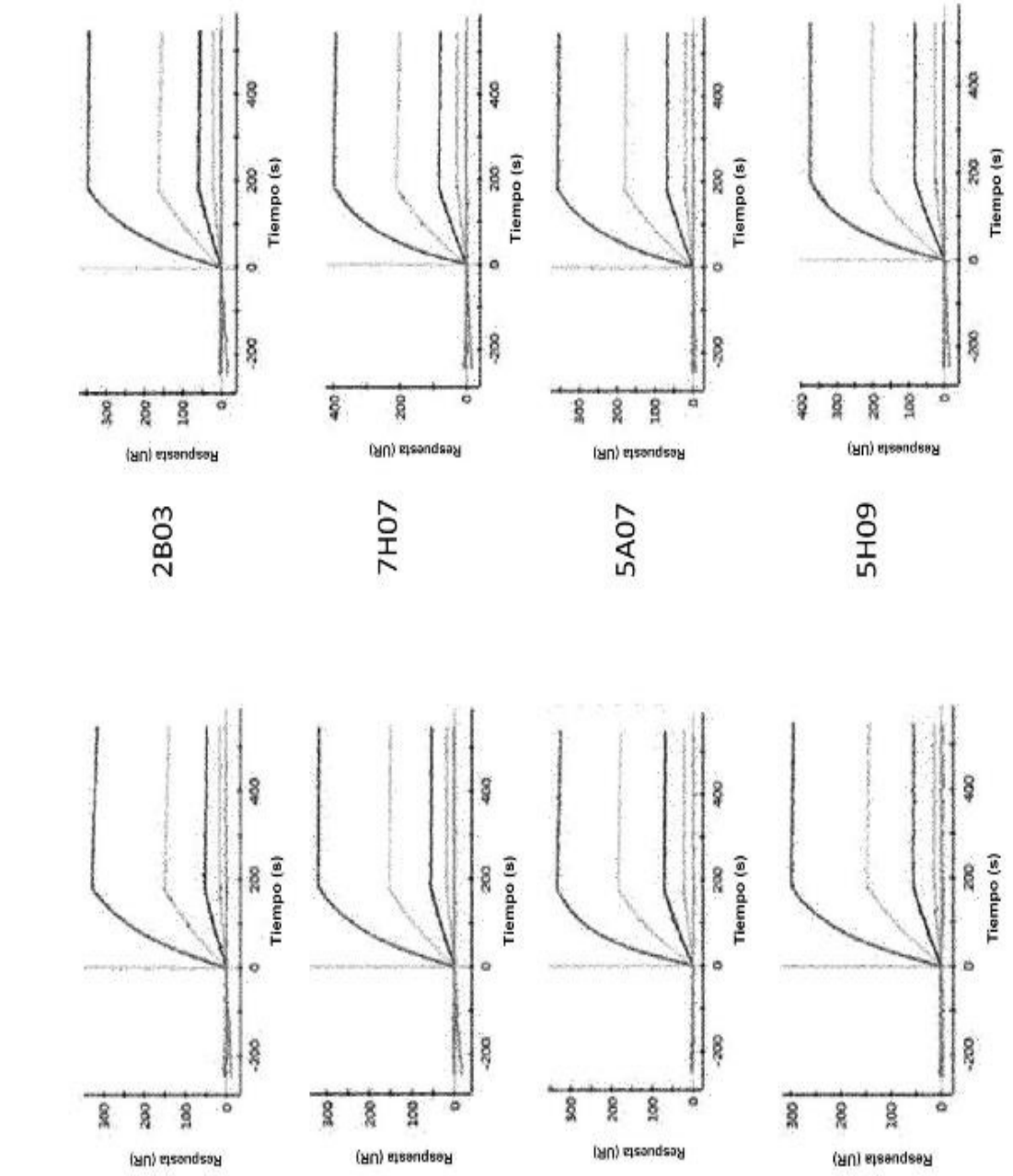

LCDR1
LCDR2
LCDR3
LC CD19 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENSNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIK
5H09
7H07
2B03
2B11
5A07
5B08
5D08
HCDR1
HCDR2
HCDR3
HC CD19 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMEWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSS
5H09
7H07
2B03
2B11
5A07
5B08
5D08

Fig. 33


original
2B11
5D08
5B08
2B03
7H07
5A07
5H09
Respuesta (UR)
Tiempo (s)

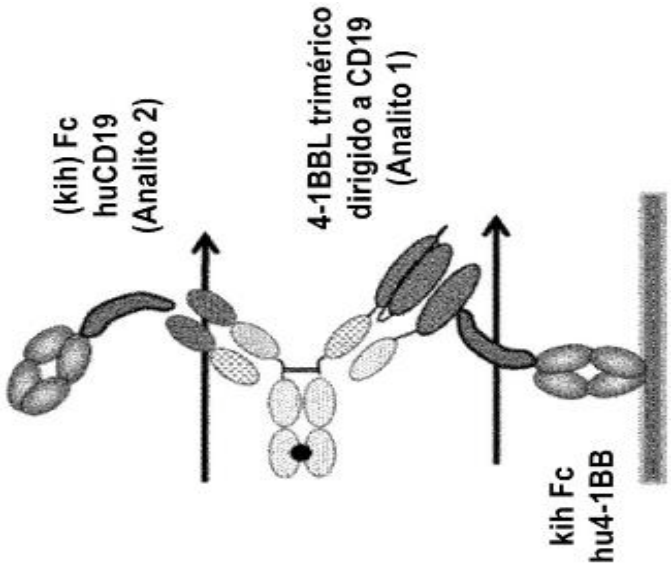

(kih) Fc
huCD19
(Analito 2)
4-1BBL trimérico
dirigido a CD19
(Analito 1)
kih Fc
hu4-1BB

Fig. 34

Fig. 35

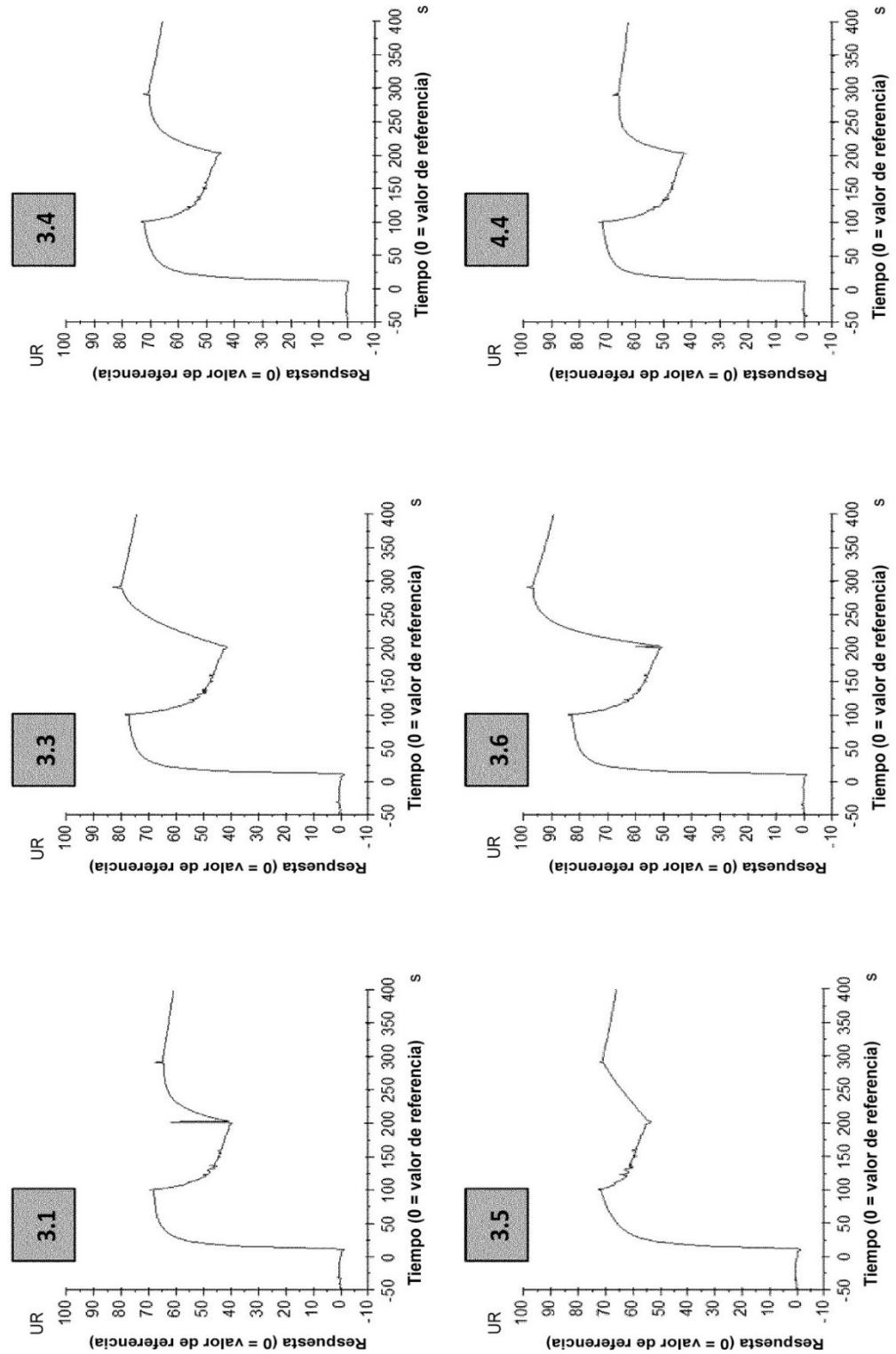

3.1
3.3
3.4
3.5
3.6
4.4
UR
Respuesta (0 = valor de referencia)
Tiempo (0 = valor de referencia)
s

Fig. 36A

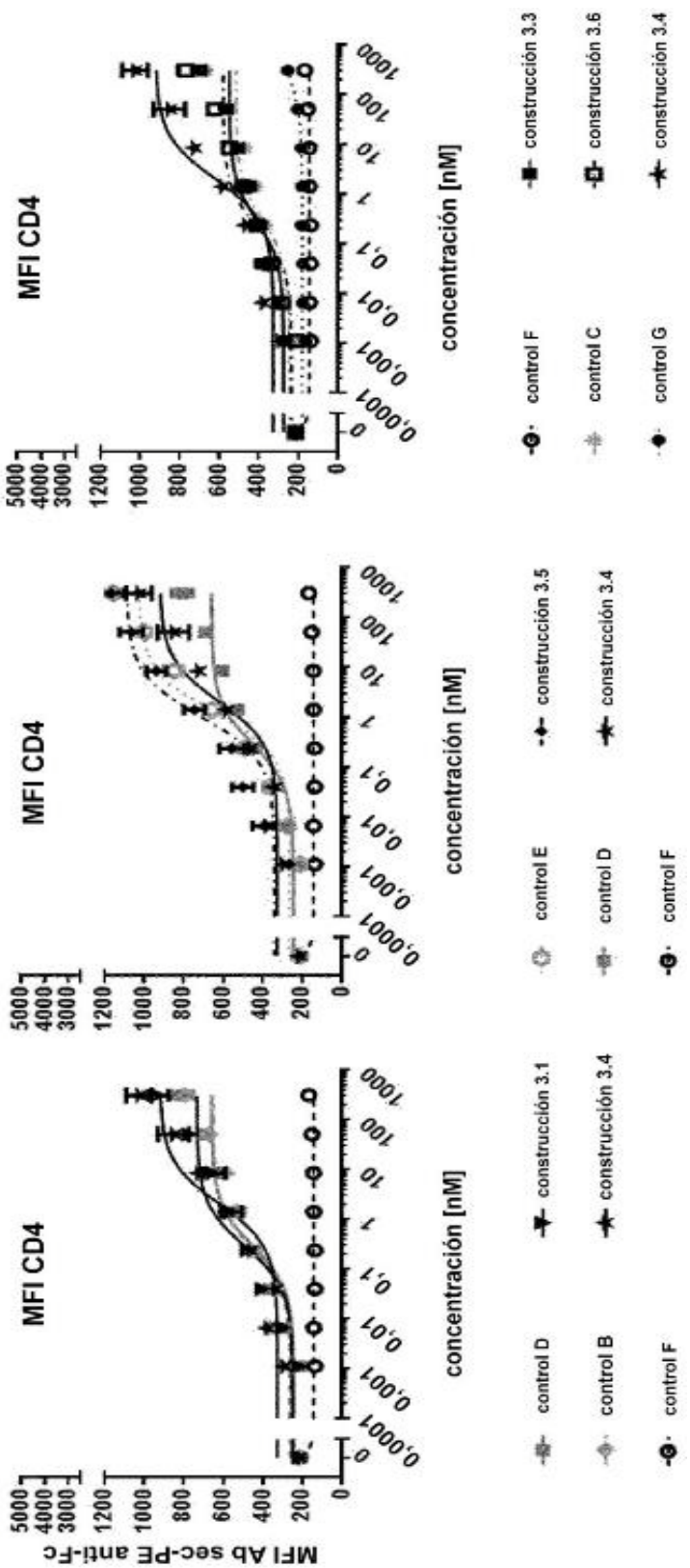

MFI Ab sec-PE anti-Fc
MFI CD4
concentración [nM]
control D
construcción 3.1
control B
construcción 3.4
control F
MFI CD4
concentración [nM]
control E
construcción 3.5
control D
construcción 3.4
control F
MFI CD4
concentración [nM]
control F
construcción 3.3
control C
construcción 3.6
control G
construcción 3.4

Fig. 36B

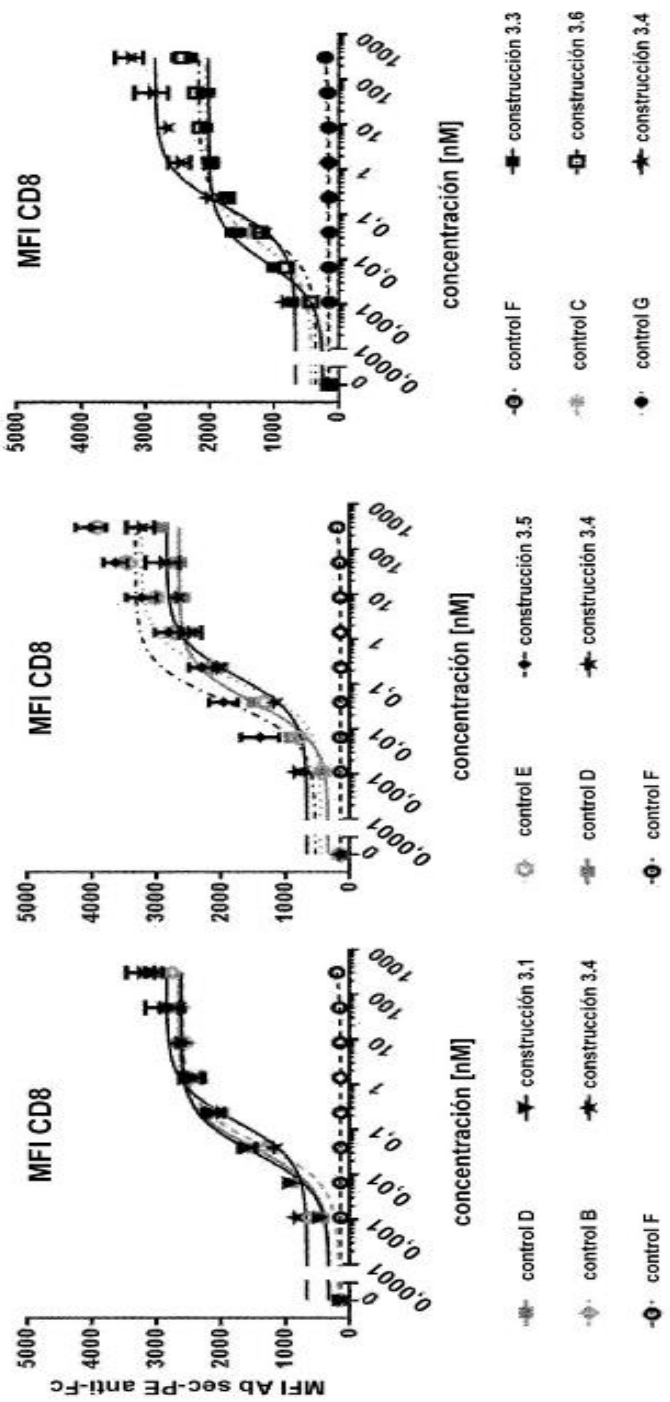

MFI Ab sec-PE anti-Fc
MFI CD8
concentración [nM]
control D
construcción 3.1
control B
construcción 3.4
control F
MFI CD8
concentración [nM]
control E
construcción 3.5
control D
construcción 3.4
control F
MFI CD8
concentración [nM]
control F
construcción 3.3
control C
construcción 3.6
control G
construcción 3.4

Fig. 37A

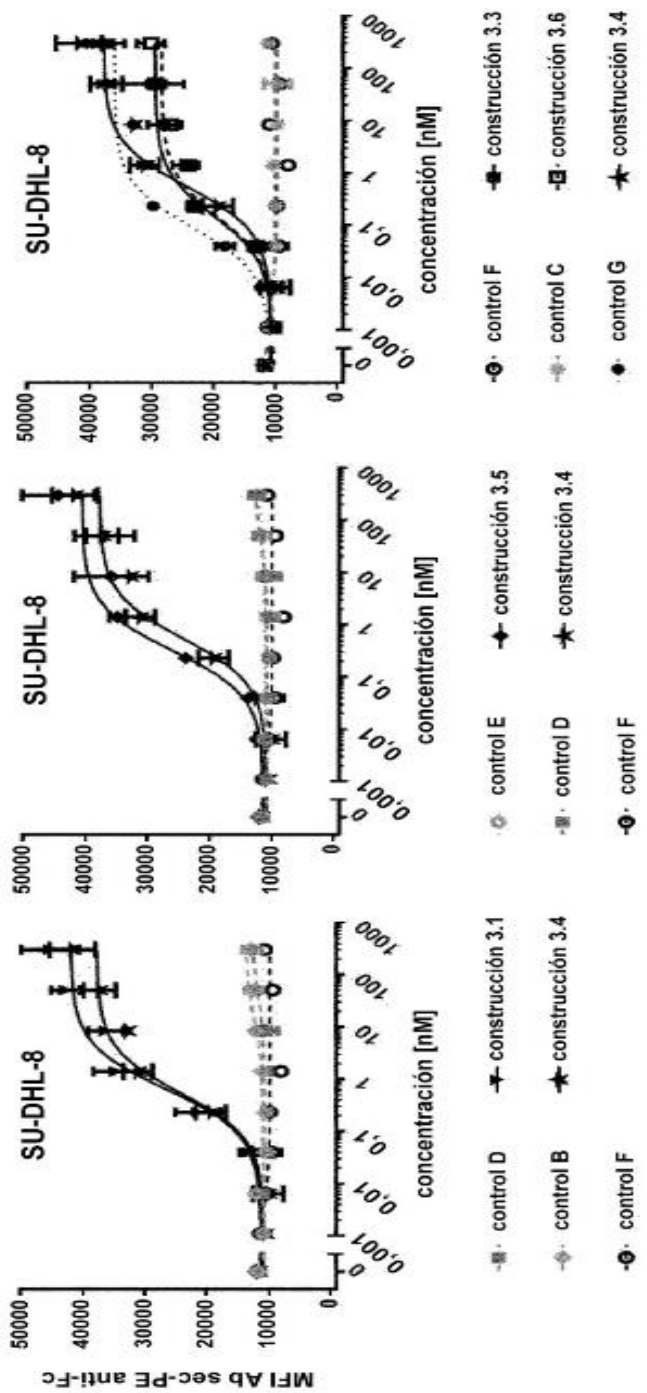

SU-DHL-8
SU-DHL-8
SU-DHL-8
MFI Ab sec-PE anti-Fc
concentración [nM]
concentración [nM]
concentración [nM]
control D
construcción 3.1
control E
construcción 3.5
control F
construcción 3.3
control B
construcción 3.4
control D
construcción 3.4
control C
construcción 3.6
control F
control F
control G
construcción 3.4

Fig. 37B

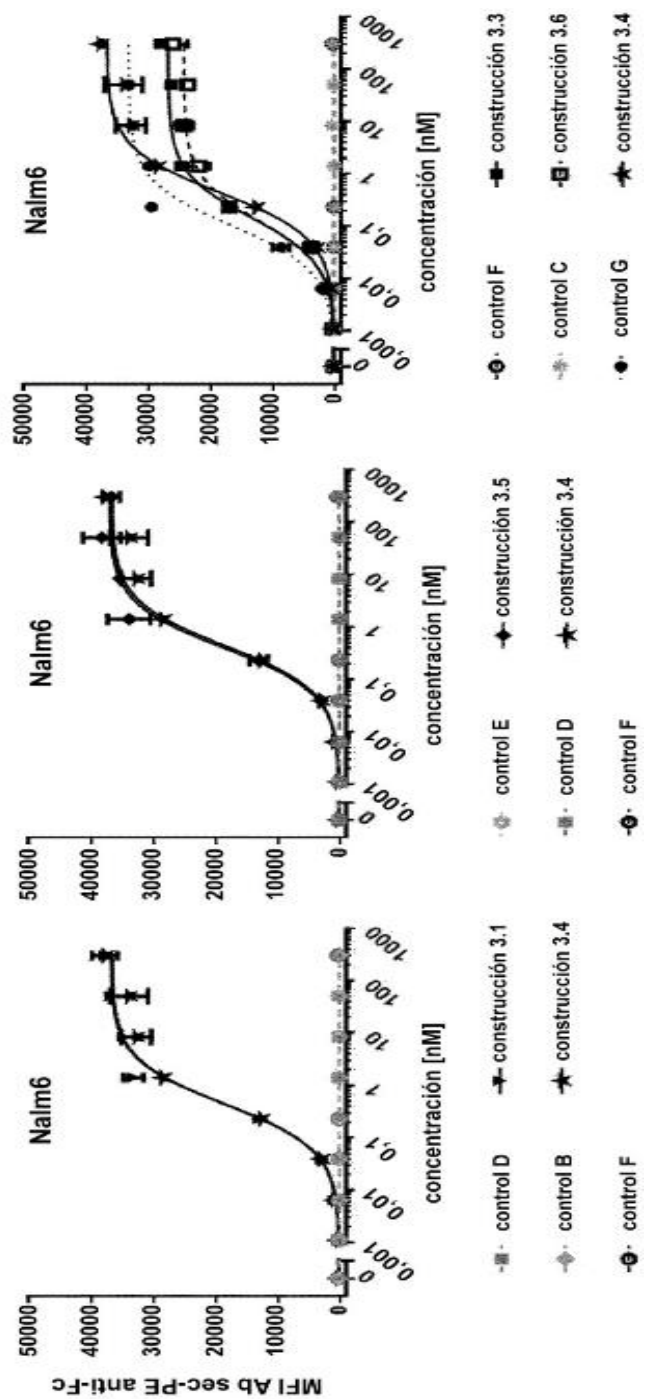

Nalm6
MFI Ab sec-PE anti-Fc
concentración [nM]
control D
construcción 3.1
control B
construcción 3.4
control F
control E
construcción 3.5
control D
construcción 3.4
control F
control F
construcción 3.3
control C
construcción 3.6
control G
construcción 3.4

Fig. 37C

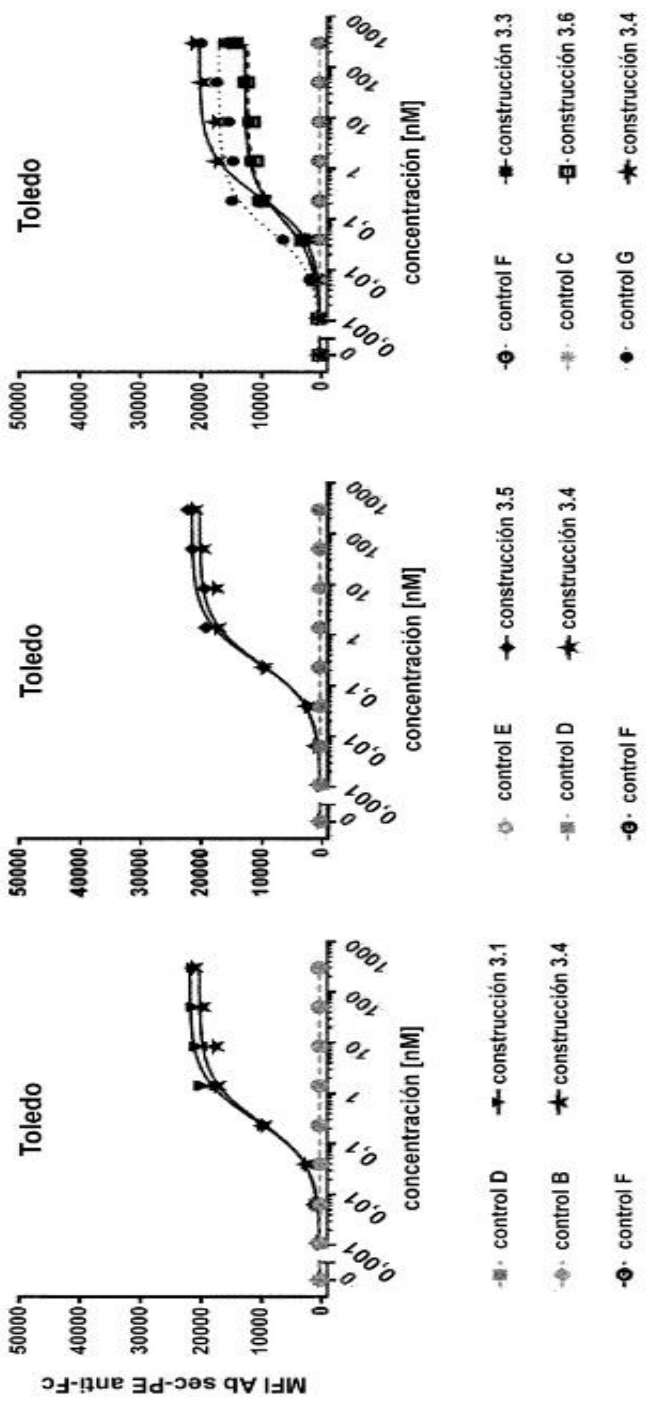

Toledo
MFI Ab sec-PE anti-Fc
concentración [nM]
control D
construcción 3.1
control B
construcción 3.4
control F
Toledo
concentración [nM]
control E
construcción 3.5
control D
construcción 3.4
control F
Toledo
concentración [nM]
control F
construcción 3.3
control C
construcción 3.6
control G
construcción 3.4

Fig. 37D

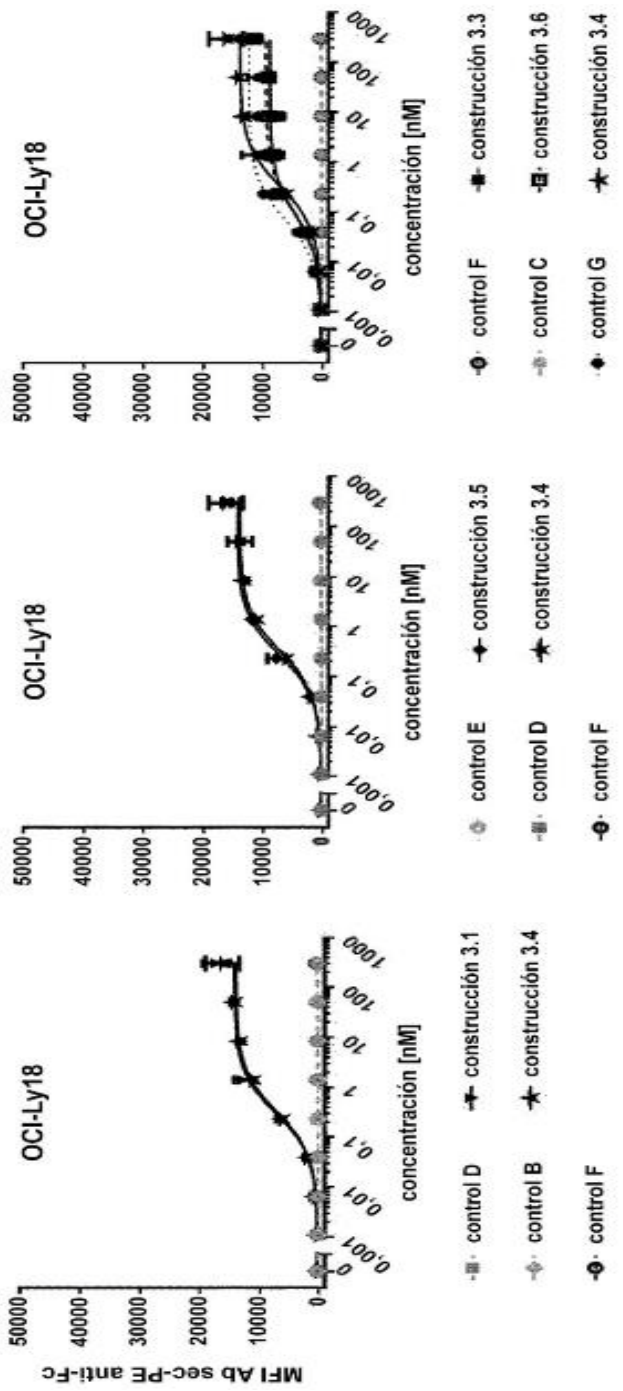

OCI-Ly18
MFI Ab sec-PE anti-Fc
concentración [nM]
control D
construcción 3.1
control B
construcción 3.4
control F
OCI-Ly18
concentración [nM]
control E
construcción 3.5
control D
construcción 3.4
control F
OCI-Ly18
concentración [nM]
control F
construcción 3.3
control C
construcción 3.6
control G
construcción 3.4

Fig. 38

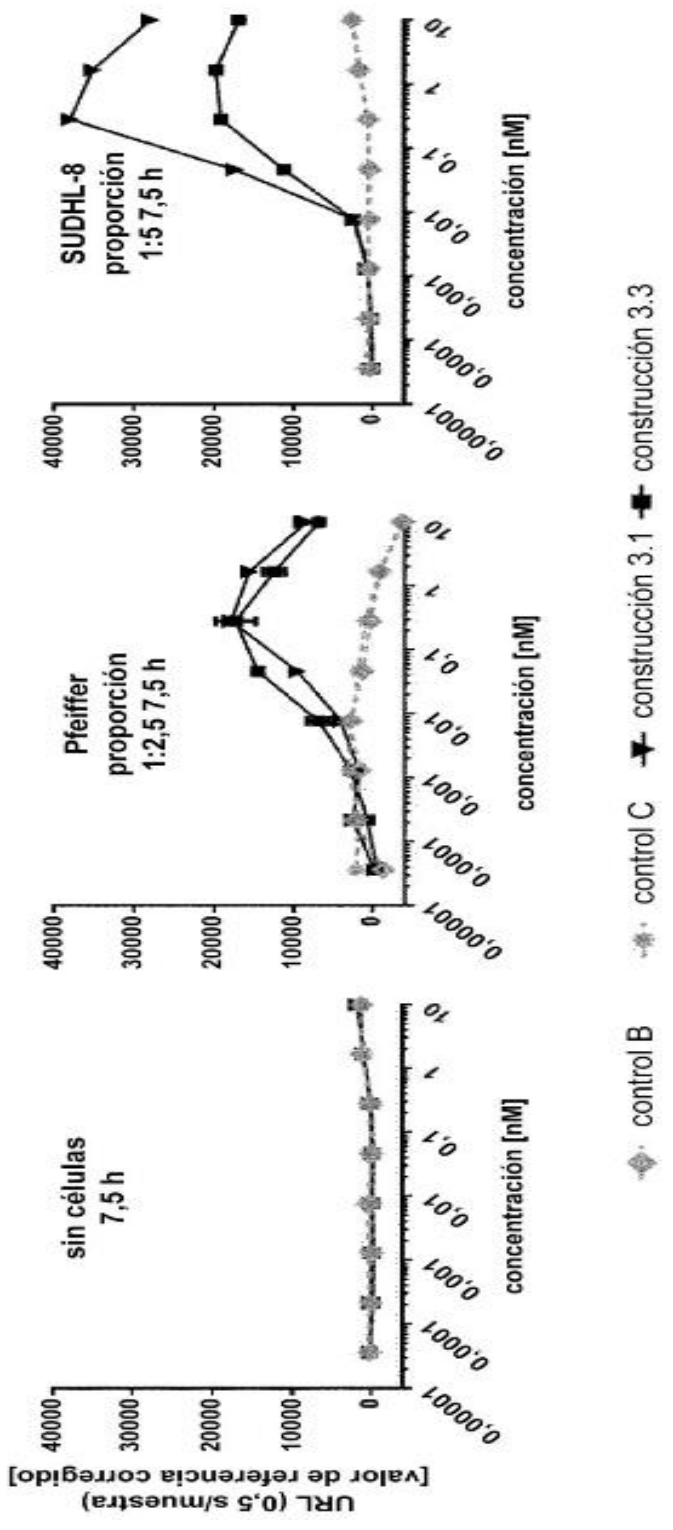

URL (0,5 s/muestra)
[valor de referencia corregido]
sin células
7,5 h
Pfeiffer
proporción
1:2,5 7,5 h
SUDHL-8
proporción
1:5 7,5 h
concentración [nM]
control B
control C
construcción 3.1
construcción 3.3

Fig. 39

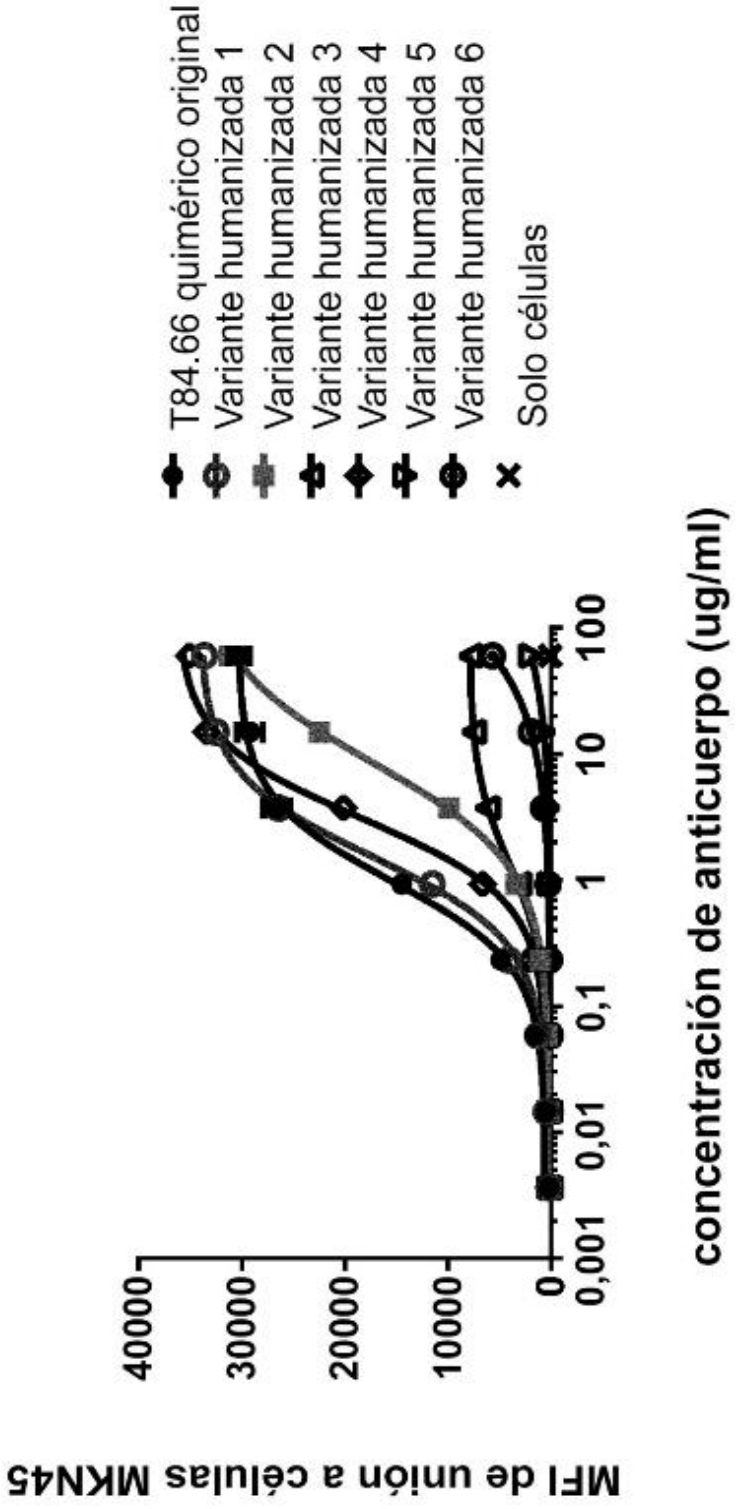

MFI de unión a células MKN45
40000
30000
20000
10000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
concentración de anticuerpo (ug/ml)
T84.66 quimérico original
Variante humanizada 1
Variante humanizada 2
Variante humanizada 3
Variante humanizada 4
Variante humanizada 5
Variante humanizada 6
Solo células

Fig. 40

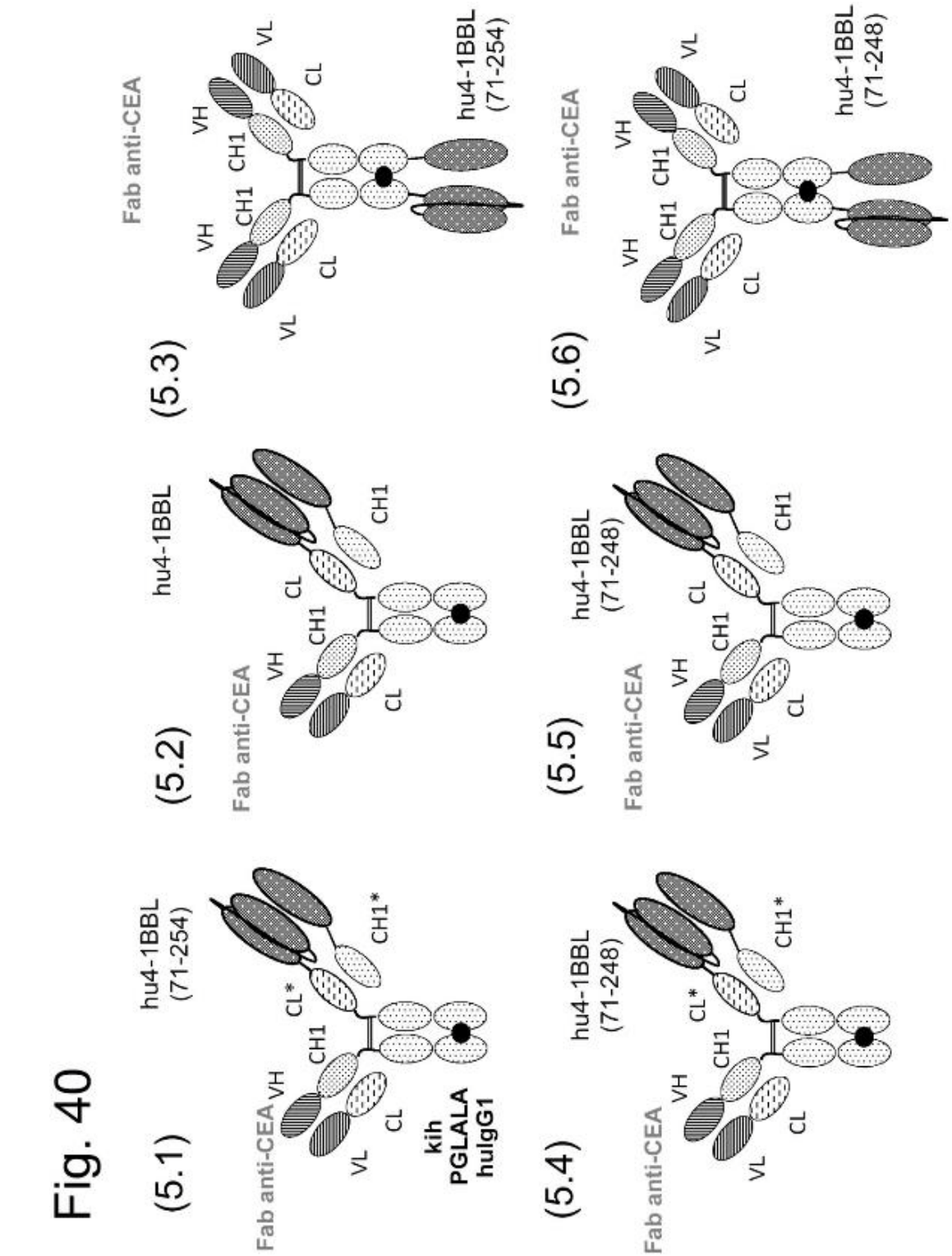

(5.1)
hu4-1BBL (71-254)
Fab anti-CEA
VH
CL*
CH1
CH1*
VL
CL
kih PGLALA huIgG1
(5.2)
hu4-1BBL
Fab anti-CEA
VH
CL
CH1
CH1
CL
VL
(5.3)
Fab anti-CEA
VH
CH1
VL
CL
VH
CH1
CL
VL
hu4-1BBL (71-254)
(5.4)
hu4-1BBL (71-248)
Fab anti-CEA
VH
CL*
CH1
CH1*
VL
CL
(5.5)
hu4-1BBL (71-248)
Fab anti-CEA
VH
CL
CH1
CH1
CL
VL
(5.6)
Fab anti-CEA
VH
CH1
VL
CL
VH
CH1
CL
VL
hu4-1BBL (71-248)

Fig. 41

(41A)

(41B)

Fig. 42

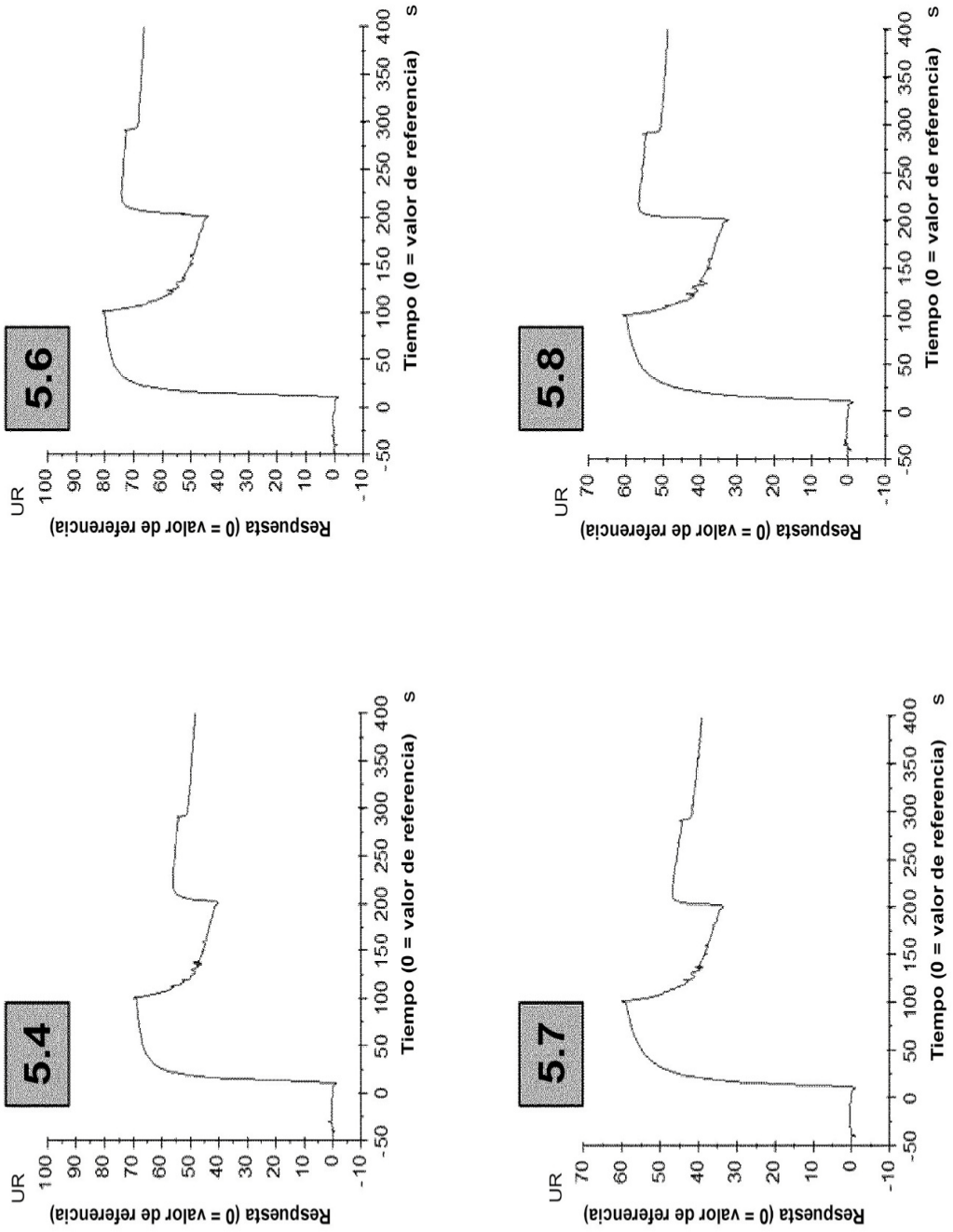

5.6
5.4
5.8
5.7
UR
Respuesta (0 = valor de referencia)
Tiempo (0 = valor de referencia) s

Fig. 43

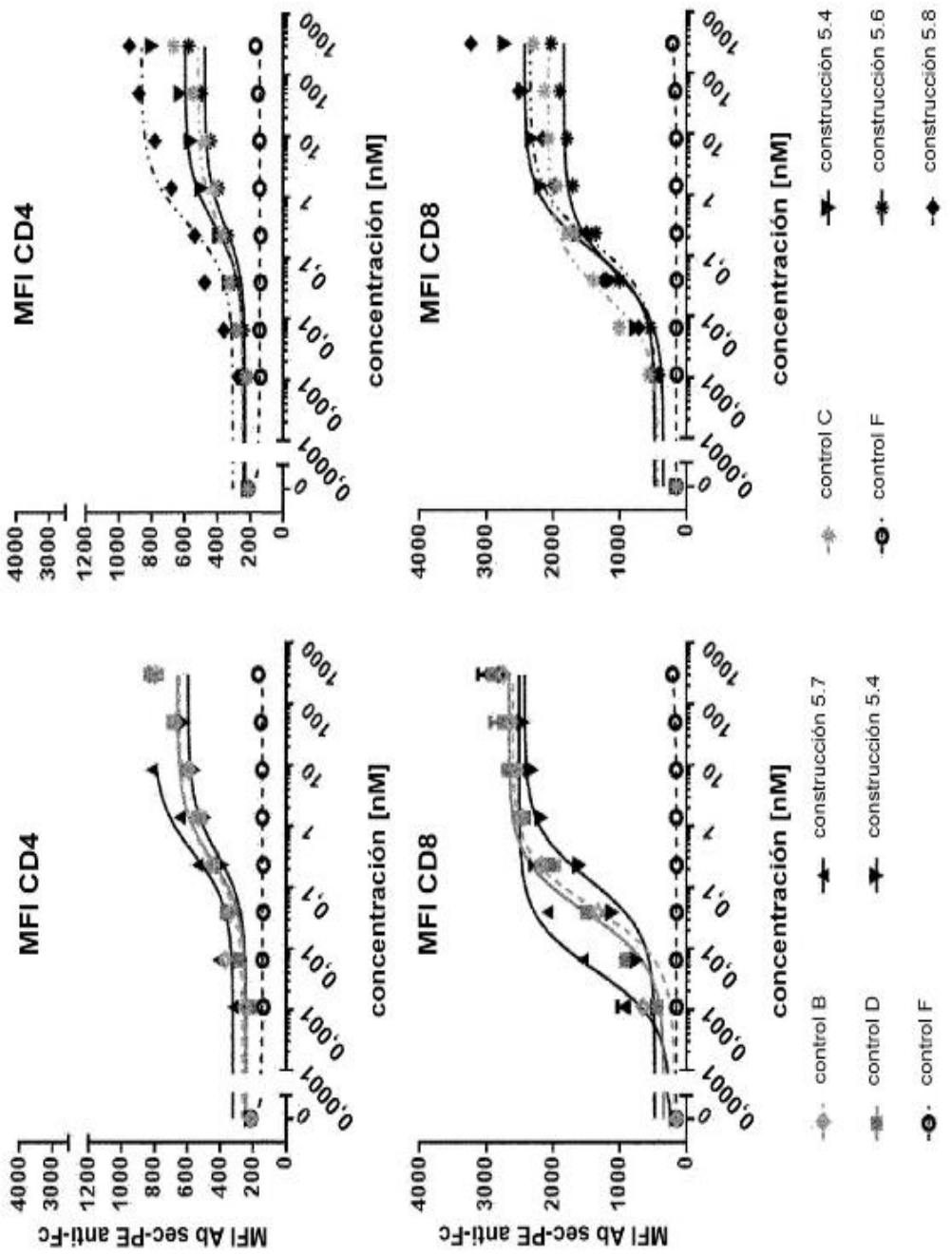

MFI CD4
MFI CD8
MFI Ab sec-PE anti-Fc
concentración [nM]
control B
control C
control D
control F
construcción 5.4
construcción 5.6
construcción 5.7
construcción 5.8

Fig. 44

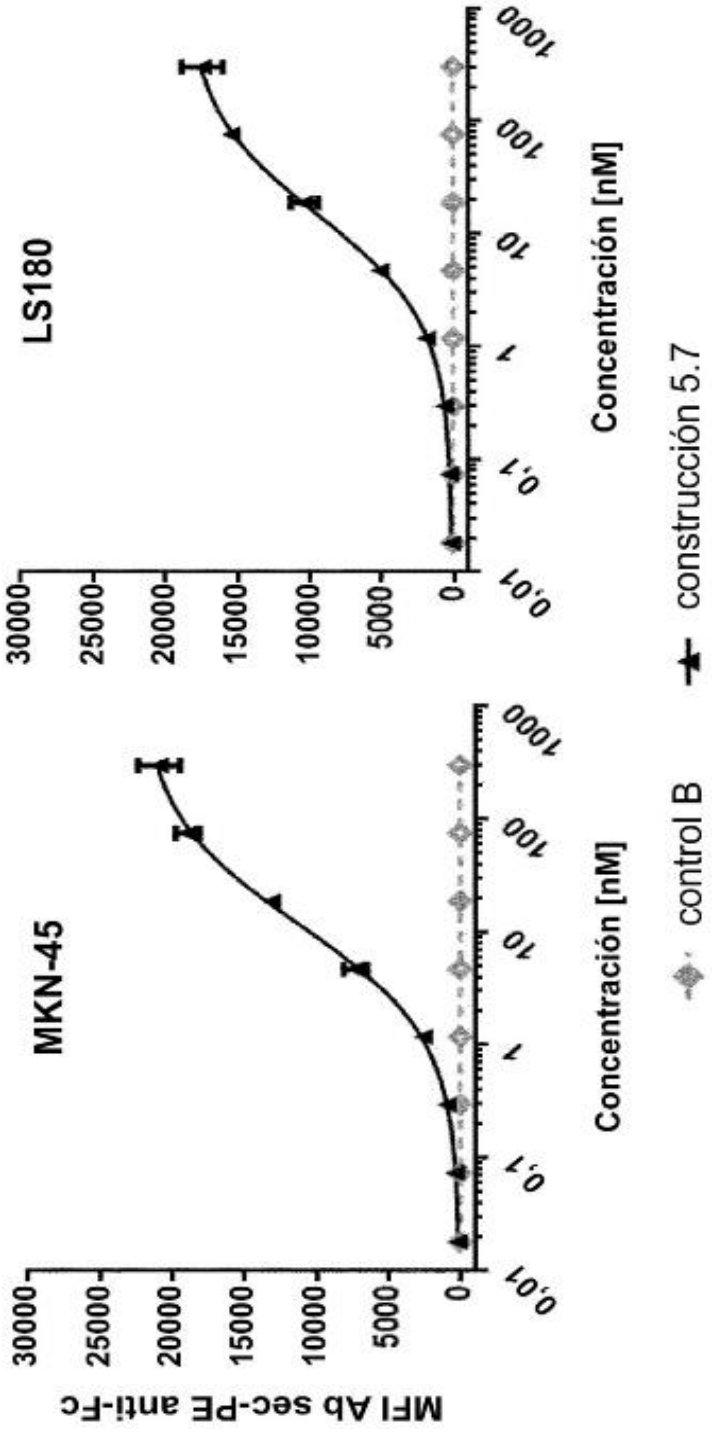

LS180
MKN-45
MFI Ab sec-PE anti-Fc
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Concentración [nM]
control B
construcción 5.7

Fig. 45

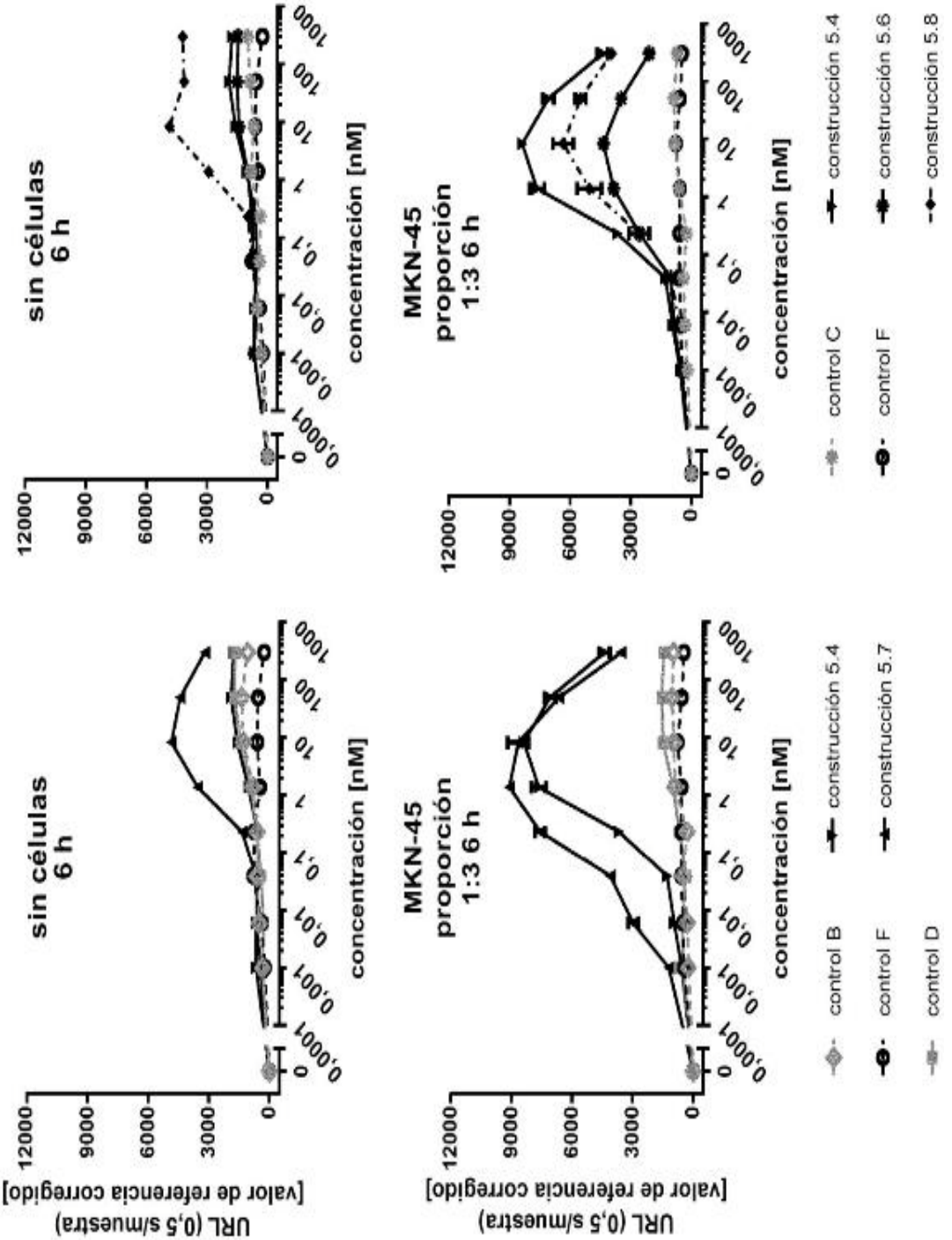

sin células
6 h
MKN-45
proporción
1:3 6 h
URL (0,5 s/muestra)
[valor de referencia corregido]
concentración [nM]
12000
9000
6000
3000
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
control B
control C
control D
control F
construcción 5.4
construcción 5.6
construcción 5.7
construcción 5.8

Fig. 46

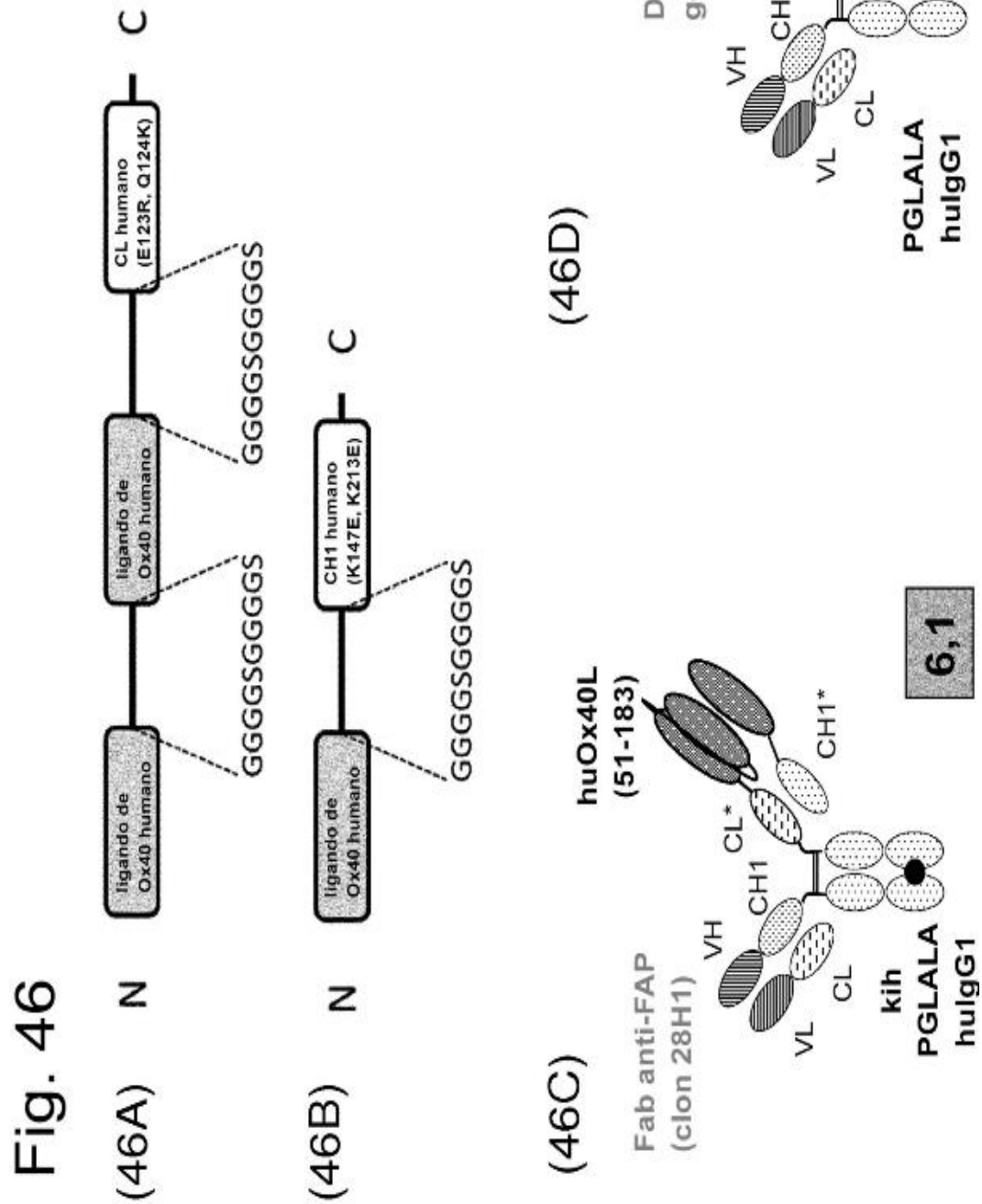

(46A)
N
C
ligando de Ox40 humano
GGGGSGGGGS
ligando de Ox40 humano
GGGGSGGGGS
CL humano (E123R, Q124K)
(46B)
N
C
ligando de Ox40 humano
GGGGSGGGGS
CH1 humano (K147E, K213E)
(46C)
Fab anti-FAP (clon 28H1)
VH
CH1
CL*
huOx40L (51-183)
VL
CL
CH1*
kih
PGLALA hulgG1
6,1
(46D)
DP47 (línea germinal)
VH
CH1
VL
CL
PGLALA hulgG1

Fig. 47A

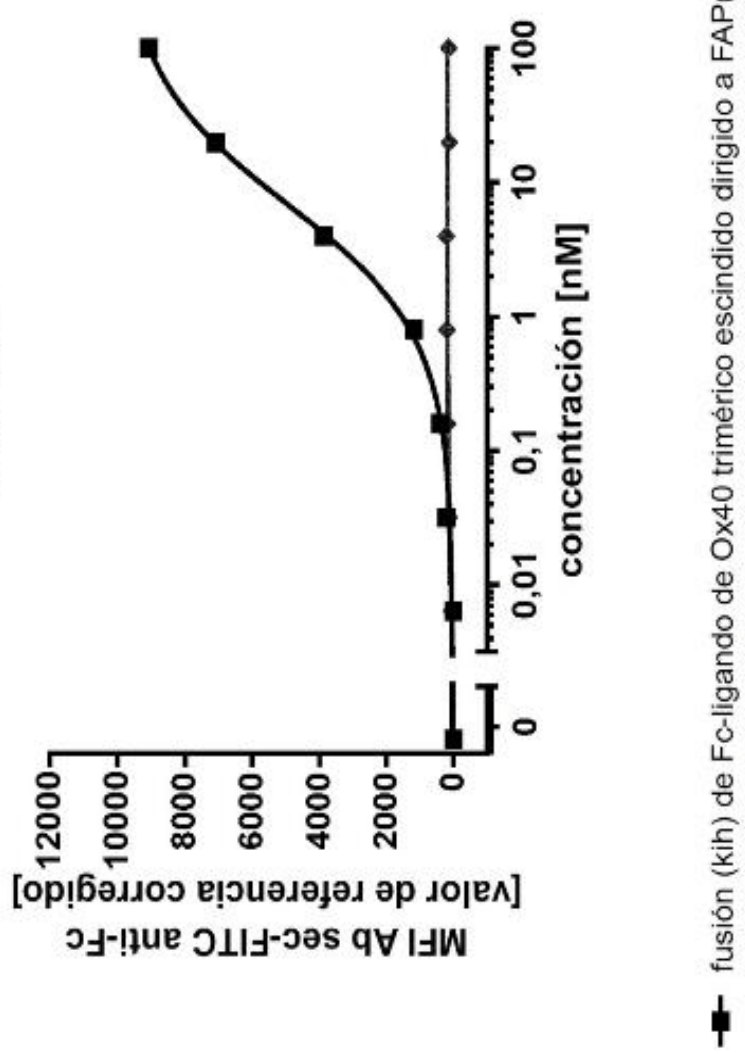

WM-266-4
MFI Ab sec-FITC anti-Fc
[valor de referencia corregido]
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
0,01
0,1
1
10
100
concentración [nM]
fusión (kih) de Fc-ligando de Ox40 trimérico escindido dirigido a FAP(28H1) monovalente
Control F

Fig. 47B

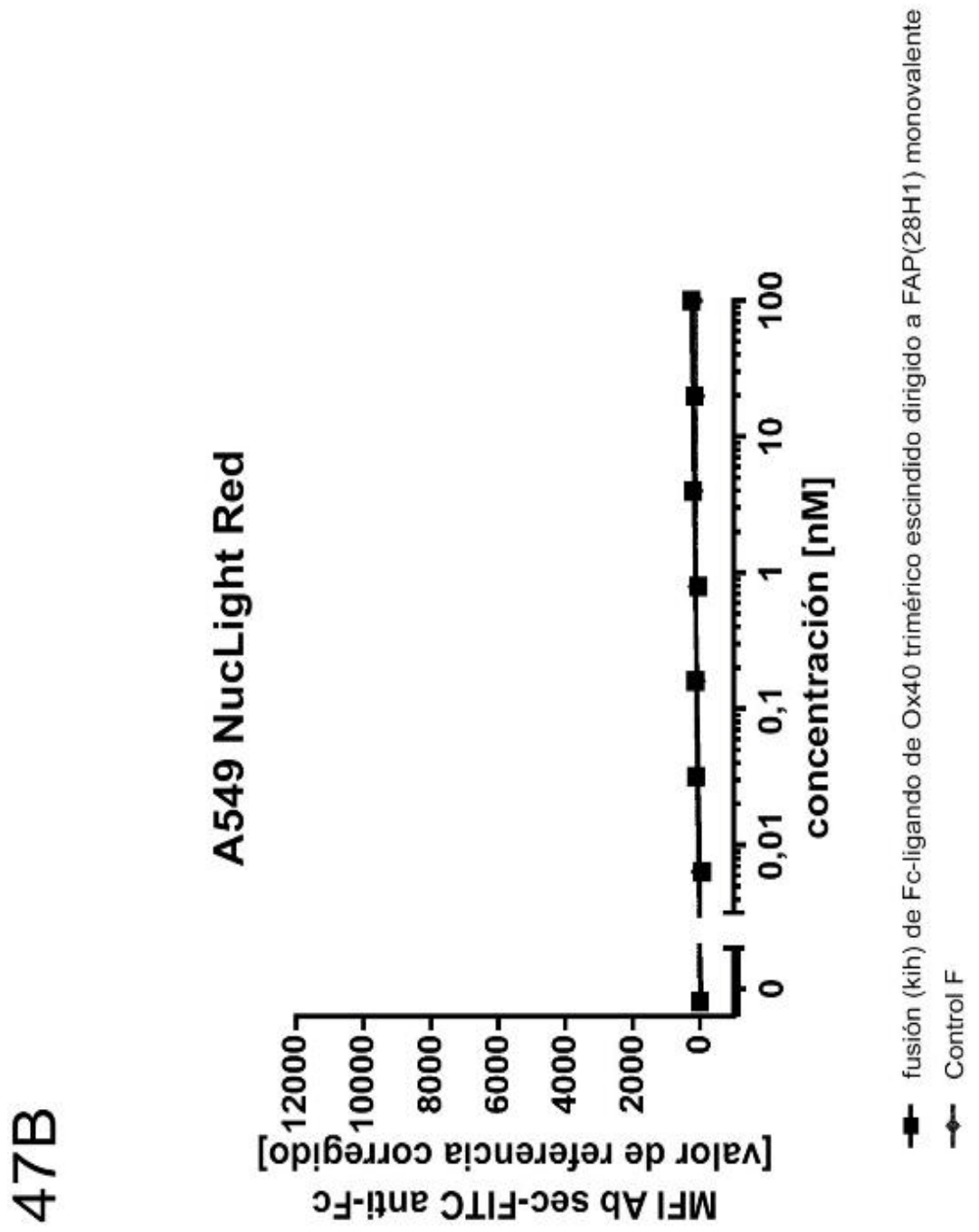
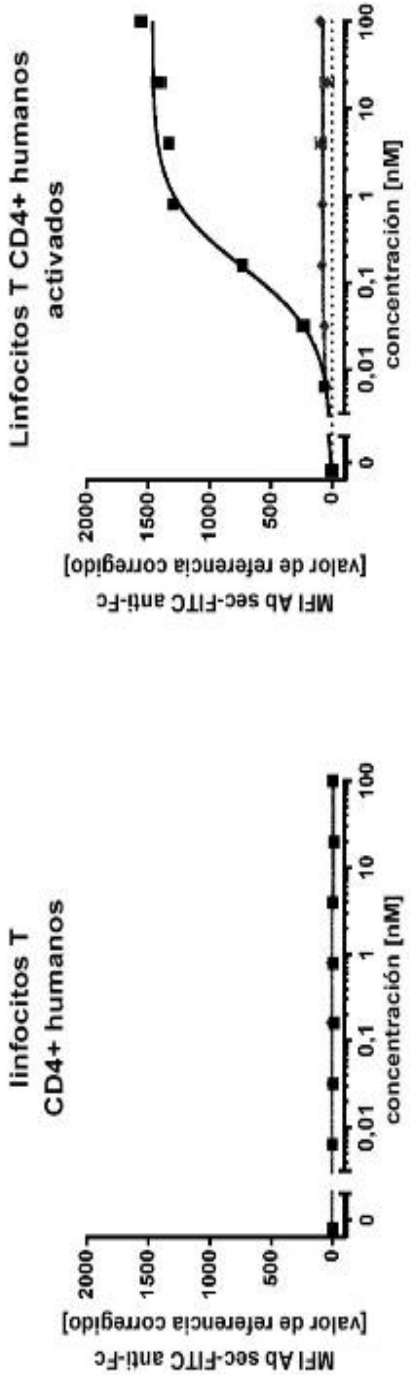

A549 NucLight Red
MFI Ab sec-FITC anti-Fc
[valor de referencia corregido]
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
0,01
0,1
1
10
100
concentración [nM]
fusión (kih) de Fc-ligando de Ox40 trimérico escindido dirigido a FAP(28H1) monovalente
Control F

Fig. 48

(48A)



(48B)

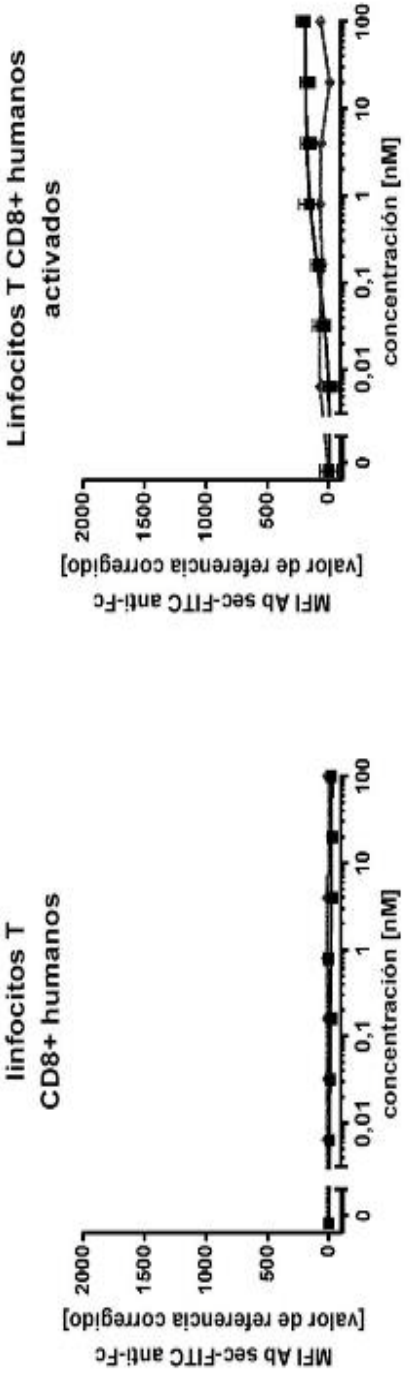


Fig. 49

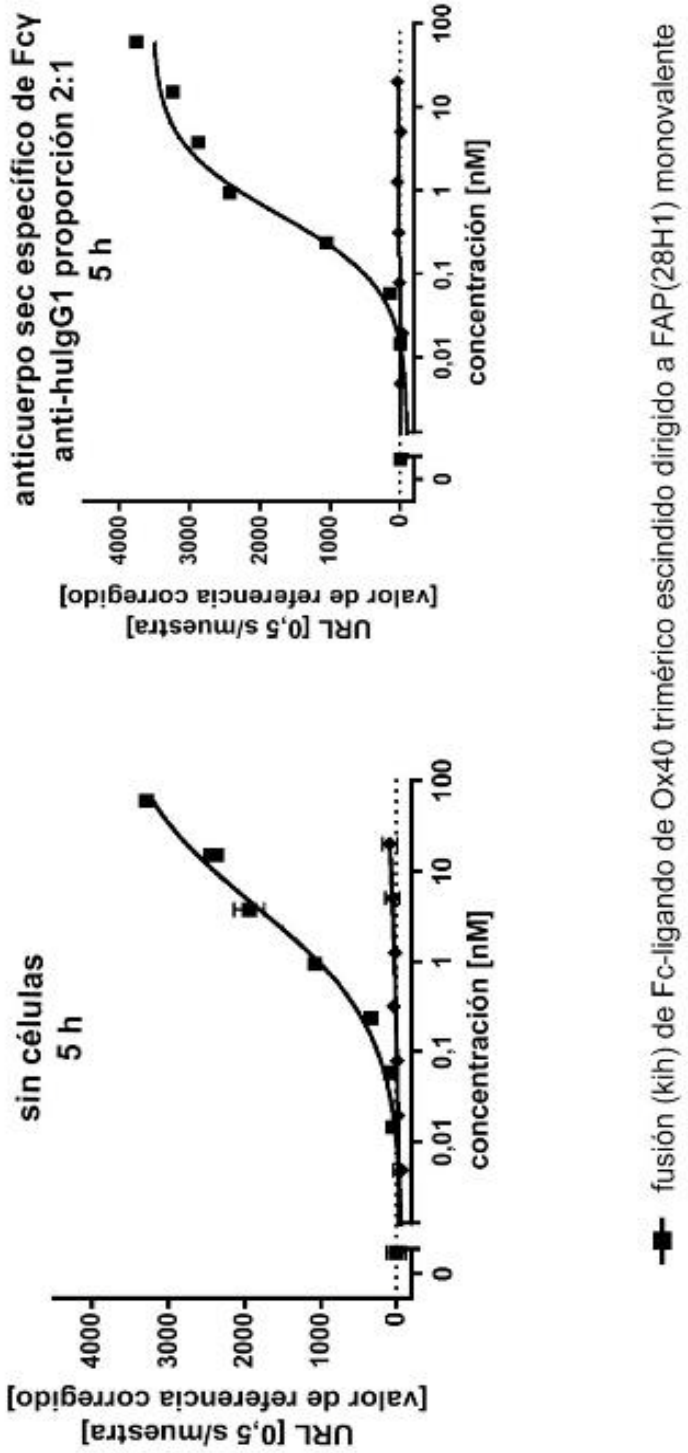

sin células
5 h
URL [0,5 s/muestra]
[valor de referencia corregido]
concentración [nM]
anticuerpo sec específico de Fcγ
anti-hulgG1 proporción 2:1
5 h
URL [0,5 s/muestra]
[valor de referencia corregido]
concentración [nM]
fusión (kih) de Fc-ligando de Ox40 trimérico escindido dirigido a FAP(28H1) monovalente
Control F

Fig. 50

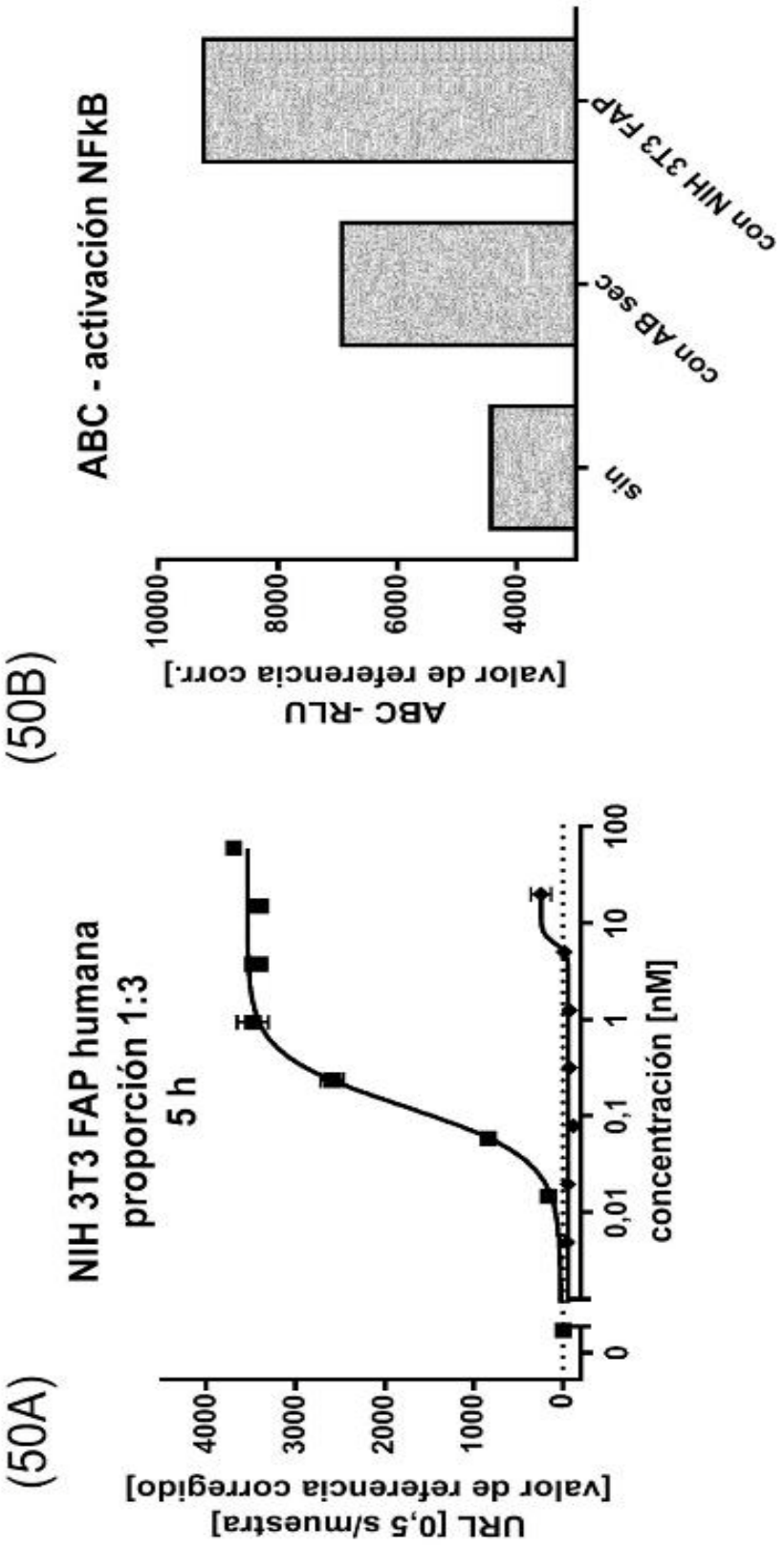
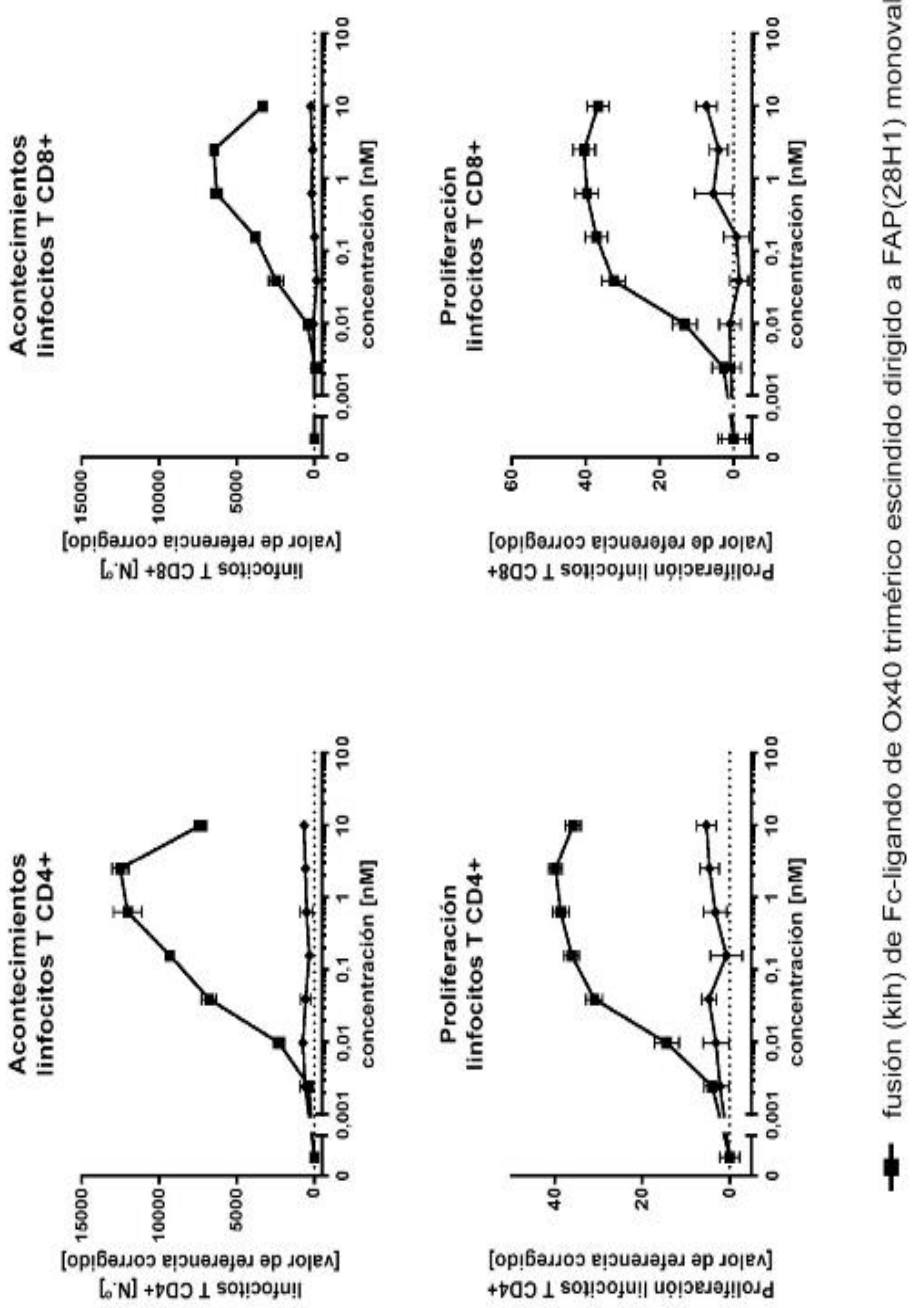

(50A)
NIH 3T3 FAP humana
proporción 1:3
5 h
URL [0,5 s/muestra]
[valor de referencia corregido]
4000
3000
2000
1000
0
0
0,01
0,1
1
10
100
concentración [nM]
(50B)
ABC - activación NFkB
ABC -RLU
[valor de referencia corr.]
10000
8000
6000
4000
sin
con AB sec
con NIH 3T3 FAP

Fig. 51


Acontecimientos linfocitos T CD8+
linfocitos T CD8+ [N.º] [valor de referencia corregido]
concentración [nM]
Proliferación linfocitos T CD8+
Proliferación linfocitos T CD8+ [valor de referencia corregido]
concentración [nM]
Acontecimientos linfocitos T CD4+
linfocitos T CD4+ [N.º] [valor de referencia corregido]
concentración [nM]
Proliferación linfocitos T CD4+
Proliferación linfocitos T CD4+ [valor de referencia corregido]
concentración [nM]
fusión (kih) de Fc-ligando de Ox40 trimérico escindido dirigido a FAP(28H1) monovalente
Control F