

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 973 788**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2015** **PCT/EP2015/067610**
87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016** **WO16016412**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2015** **E 15753906 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024** **EP 3186279**

54 Título: **Construcciones de anticuerpo para CDH19 y CD3**

30 Prioridad:

31.07.2014 US 201462031770 P45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
24.06.2024

73 Titular/es:

AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH (50.0%)
Staffelseestrasse 2
81477 München, DE y
AMGEN INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

KUFER, PETER;
HOFFMANN, PATRICK;
RAUM, TOBIAS;
LUTTERBUESE, RALF;
NAHRWOLD, ELISABETH;
BLUMEL, CLAUDIA;
XIAO, SHOUHUA;
PAN, ZHENG y
WICKRAMASINGHE, DINELI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María IsabelObservaciones:

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

ES 2 973 788 T3

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

DESCRIPCIÓN

Construcciones de anticuerpo para CDH19 y CD3

La presente invención se refiere a una construcción de anticuerpo biespecífica según se define en las reivindicaciones adjuntas. Por otra parte, la invención proporciona un polinucleótido que codifica la construcción de anticuerpo, un vector que comprende dicho polinucleótido y una célula anfitriona transformada o transfectada con dicho polinucleótido o vector. Además, la invención proporciona un procedimiento para la producción de la construcción de anticuerpo de la invención, la construcción de anticuerpo de la invención para el uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad según se define en las reivindicaciones y un estuche que comprende dicha construcción de anticuerpo.

El melanoma es un cáncer de piel que está provocado por la transformación oncogénica de melanocitos, que son células cutáneas productoras de pigmentos. Hasta 2009, el melanoma tenía una prevalencia de más de 870.000 casos solo en los EE. UU. (US National Institutes of Health). Cada año, se diagnostican más de 75.000 nuevos casos de melanoma en los EE. UU., y aproximadamente 25% de los pacientes tienen enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico. A pesar del hecho de que los casos de melanoma primario se pueden curar mediante cirugía si se detectan suficientemente pronto, el melanoma es la principal causa de muerte por enfermedades cutáneas en los EE. UU., responsable de alrededor de 10.000 muertes al año en los EE. UU.. Una vez que la enfermedad se ha extendido y convertido en metastásica, el pronóstico es malo, con una supervivencia relativa de 5 años del 15%.

Existen cuatro tipos básicos de melanomas. Tres tipos se encuentran en las capas superiores de la piel y el cuarto es invasivo y ha penetrado más profundamente en la piel y puede haberse extendido a otras zonas del cuerpo.

El melanoma de extensión superficial es el tipo más común de melanoma que representa alrededor de 70% de todos los casos. Crece a lo largo de la capa superior de la piel durante un tiempo bastante prolongado antes de penetrar más profundamente. Aparece en primer lugar como una mancha descolorida plana o ligeramente sobresaliente que tiene límites irregulares y puede tener una forma algo asimétrica. El color varía, y se pueden observar zonas de color moreno, pardo, negro, rojo, azul o blanco. Este tipo de melanoma se puede producir en un lunar previamente benigno y se encuentra lo más a menudo en personas jóvenes.

El lentigo maligno es similar al tipo de extensión superficial, ya que también permanece cerca de la superficie de la piel durante bastante tiempo, y habitualmente aparece como una decoloración morena, parda u oscura moteada plana o suavemente elevada. Se encuentra lo más a menudo en la ancianidad. Cuando este cáncer se vuelve invasivo, se denomina melanoma sobre lentigo maligno.

El melanoma lentiginoso acro también se extiende superficialmente antes de penetrar más profundamente. Sin embargo, es bastante diferente de los otros, ya que habitualmente aparece como una decoloración negra o parda bajo las uñas o sobre las plantas de los pies o las palmas de las manos. Este tipo de melanoma se encuentra a veces en personas de piel oscura, y a menudo puede avanzar más rápidamente que el melanoma de extensión superficial y el lentigo maligno.

El melanoma nodular habitualmente es invasivo en el momento del primer diagnóstico. La malignidad se reconoce cuando se convierte en un bulto. Habitualmente es negro, pero ocasionalmente es azul, gris, blanco, pardo, moreno, rojo o del tono de la piel. Este es el más agresivo de los melanomas, y se encuentra en de 10 a 15 por ciento de los casos.

Los tratamientos comunes para el melanoma metastásico incluyen quimioterapia, terapias dirigidas para pacientes elegibles (p. ej. tratamiento con inhibidores de BRAF para pacientes con mutaciones de BRAF) e inmunoterapia. El melanoma metastásico es un tipo de tumor en que se ha demostrado que la inmunoterapia no solo frena la progresión de la enfermedad sino que conduce a curaciones en pacientes en fase avanzada. La interleucina-2 se ha aprobado para el uso en melanoma metastásico en 1998, y en 2011 un anticuerpo que se dirige a CTLA4, un miembro de una nueva generación de inhibidores del punto de control inmunitario, obtuvo aprobación por la FDA. El documento WO 2006/071441 A2 divulga anticuerpos monoclonales totalmente humanos que se unen específicamente a GPNMB, y sus usos así como anticuerpos biespecíficos que comprenden un componente de anticuerpo anti-GPNMB y un componente anti-CD3, y método de uso de estos anticuerpos biespecíficos. Bertucci y cols, Anticancer Research - International Journal of Cancer Research and Treatment, vol. 27, nº 5A, 1 de septiembre de 2007, páginas 3441-3449, XP009154071, divulgan que la obtención del perfil de expresión génica de líneas celulares de melanoma humano con distinto potencial metastásico identifica nuevos marcadores de progresión.

CDH19 es una proteína transmembranaria de cadherina tipo II de función desconocida. El gen humano se clonó en 2000 basándose en su similitud de secuencia con CDH7 (Kools, P. y cols. Genomics. 2000). Se aislaron etiquetas de secuencias expresadas (EST) para CDH19 de bibliotecas de ADNc de melanocitos, indicando que la expresión de CDH19 puede limitarse a células de origen en la cresta neural (Kools, P. y cols. Genomics. 2000). En apoyo de esta noción, se encontró que CDH19 de rata se expresa principalmente en ganglios nerviosos y en células de Schwann durante el desarrollo embrionario de la rata (Takahashi, M. and Osumi, O. Devl Dynamics. 2005).

Anticuerpos de diagnóstico que detectan CDH19 en transferencia Western, inmunohistoquímica o citometría de flujo

son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Esos anticuerpos comprenden anticuerpos poli- y monoclonales generados en anfitriones animales.

En un análisis interno de datos de expresión de ARNm comerciales, se ha encontrado sorprendentemente que la expresión de CDH19 es elevada en tumores de melanoma tanto primarios como metastásicos en comparación con tejidos normales no transformados. El análisis interno también confirmaba que la expresión de CDH19 en tejidos normales se limita a ganglios nerviosos y fibras nerviosas periféricas derivados de la cresta neural. La expresión diferencial de CDH19 en tejidos normales y tumorales hace esta proteína atractiva para terapéutica de direccionamiento a la superficie celular. Aunque CDH19 se analizó como un marcador como parte de listas largas de marcadores asociados con algunos tipos de cáncer (véase, p. ej., el documento WO 2009/055937) o la enfermedad de Parkinson (véase, p. ej., el documento WO 2005/067391), CDH19 nunca se analizó como un marcador de pronóstico o una diana farmacológica en relación con tumores de melanoma.

Como todavía existe una necesidad de disponer de opciones adicionales para el tratamiento del melanoma, se proporcionan con el presente documento medios y métodos para la resolución de este problema en forma de una construcción de anticuerpo biespecífica con un dominio de unión dirigido a CDH19 y con un segundo dominio de unión dirigido a CD3 en células T.

Así, la presente invención proporciona una construcción de anticuerpo biespecífica según se define en las reivindicaciones adjuntas.

Según se describe en el ejemplo 3 adjunto, se ha caracterizado un amplio número de dominios de unión específicos para CDH19 con respecto a sus especificidades de unión, y esos dominios de unión se clasificaron en dos grupos diferentes, reconociendo cada grupo específicamente una agrupación de epítomos de CDH19. Las agrupaciones de epítomos que se definían – en el contexto de la presente invención – en el dominio extracelular de CDH19 humano se representan en la Figura 5. Se identificó que el primer grupo de dominios de unión se unía a la agrupación de epítomos 1 de CDH19 humano y abarca los dominios de unión que comprenden las secuencias de CDRs representadas bajo el punto (a) anterior. Este primer grupo de dominios de unión preferiblemente no se une a ningún epítomo o agrupación de epítomos adicional (excepto la agrupación de epítomos 1) dentro de la secuencia de aminoácidos de CDH19. Se identificó que el segundo grupo de dominios de unión se une a la agrupación de epítomos 3 de CDH19 humano y abarca los dominios de unión que comprenden las secuencias de CDRs representadas bajo el punto (b) anterior. Este segundo grupo de dominios de unión preferiblemente no se une a ningún epítomo o agrupación de epítomos adicional (excepto la agrupación de epítomos 3) dentro de la secuencia de aminoácidos de CDH19. Las agrupaciones de epítomos 1 y 3 de CDH19 humano corresponden a residuos de aminoácido como 44-141 en SEQ ID NO: 1836 (agrupación de epítomos 1) y 250-364 SEQ ID NO: 1836 (agrupación de epítomos 3).

Se debe apuntar que según se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "uno(a)" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de estos reactivos diferentes y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos normales en la técnica que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en el presente documento.

A menos que se indique otra cosa, se ha de entender que el término "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a cualquier elemento de la serie.

El término "y/o" siempre que se use en el presente documento incluye el significado de "y", "o" y "todas y cada una de las combinaciones de los elementos conectados por dicho término".

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprende", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implica la inclusión de un número entero, o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. Cuando se use en el presente documento, el término "que comprende" se puede sustituir por el término "que contiene" o "que incluye" o a veces cuando se use en el presente documento por el término "que tiene".

Cuando se use en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de la reivindicación. Cuando se use en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afecten materialmente a las características básicas y nuevas de la reivindicación.

En cada caso en el presente documento cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se puede reemplazar por cualquiera de los otros dos términos.

El término "construcción de anticuerpo" se refiere a una molécula en la que la estructura y/o función se basa o se basan en la estructura y/o la función de un anticuerpo, p. ej. de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o entera. De ahí que una construcción de anticuerpo sea capaz de unirse a su diana o antígeno específicos. Además, una construcción de anticuerpo según la invención comprende los requisitos estructurales mínimos de un anticuerpo que permitan la unión a la diana. Este requisito mínimo se define en las reivindicaciones adjuntas.

Las construcciones de anticuerpo según la invención están en el formato (scFv)₂.

Las construcciones de anticuerpo de la presente invención son preferiblemente "construcciones de anticuerpo generadas *in vitro*". Este término se refiere a una construcción de anticuerpo según la definición anterior donde la totalidad o parte de la región variable (p. ej., al menos una CDR) se genera en una selección de células no inmunitarias, p. ej., un despliegue en fagos *in vitro*, un chip proteínico o cualquier otro método en el que se puedan probar posibles secuencias con respecto a su capacidad para unirse a un antígeno. Así, este término excluye preferiblemente secuencias generadas solamente mediante reordenación genómica en una célula inmunitaria en un animal. Un "anticuerpo recombinante" es un anticuerpo elaborado a través del uso de tecnología de ADN recombinante o manipulación genética.

El término "anticuerpo monoclonal" (mAb) o construcción de anticuerpo monoclonal según se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural y/o modificaciones (p. ej., isomerizaciones, amidaciones) postraduccionales que puedan estar presente en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un solo sitio o determinante antigénico en el antígeno, en contraste con preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (o epítomos). Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se sintetizan mediante el cultivo de hibridomas, de ahí que no estén contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo cuando es obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe considerar que requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método particular.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede usar cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos continuos de líneas celulares. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar se pueden elaborar mediante el método de hibridomas descrito en primer lugar por Koehler y cols., *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden elaborar mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N° 4.816.567). Ejemplos de técnicas adicionales para producir anticuerpos monoclonales humanos incluyen la técnica de triomas, la técnica de hibridomas de células B humanas (Kozbor, *Immunology Today* 4 (1983), 72) y la técnica de hibridomas de EBV (Cole y cols., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

Los hibridomas se pueden cribar a continuación usando métodos estándar, tales como el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) y el análisis por resonancia de plasmones superficiales (BIAcore™), para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno especificado. Cualquier forma de antígeno pertinente se puede usar como el inmunógeno, p. ej., antígeno recombinante, formas presentes en la naturaleza, cualesquiera de sus variantes o fragmentos, así como uno de sus péptidos antigénicos. La resonancia de plasmones superficiales que se emplea en el sistema de BIAcore se puede usar para incrementar la eficacia de anticuerpos fágicos que se unen a un epítipo de un antígeno diana, tal como CDH19 o CD3 épsilon (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmberg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13).

Otro método ejemplar para elaborar anticuerpos monoclonales incluye cribar bibliotecas de expresión proteínica, p. ej., bibliotecas de despliegue en fagos o presentación en ribosomas. El despliegue en fagos se describe, por ejemplo, en Ladner y cols., Patente de EE. UU. N° 5.223.409; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317, Clackson y cols., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks y cols., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

Además del uso de bibliotecas de presentación, el antígeno pertinente se puede usar para inmunizar a un animal no humano, p. ej., un roedor (tal como un ratón, un hámster, un conejo o una rata). En un ejemplo que no es parte de la invención reivindicada, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humano. Por ejemplo, es posible manipular cepas de ratón deficientes en producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los locus de Ig (inmunoglobulina) humana. Usando la tecnología de hibridomas, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos de antígenos, derivados de los genes con la especificidad deseada. Véanse, p. ej., XENOMOUSE™, Green y cols. (1994) *Nature Genetics* 7:13-21, los documentos US 2003-0070185, WO 96/34096 y WO96/33735.

Un anticuerpo monoclonal también se puede obtener a partir de un animal no humano, y a continuación modificarse, p. ej., humanizarse, desinmunizarse, hacerse quimérico etc., usando técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Ejemplos de construcciones de anticuerpo modificadas incluyen variantes humanizadas de anticuerpos no humanos, anticuerpos "madurados por afinidad" (véase, p. ej., Hawkins y cols. *J. Mol. Biol.* 254, 889-896 (1992) y Lowman y cols., *Biochemistry* 30, 10832-10837 (1991)) y mutantes de anticuerpo con función o funciones efectoras alteradas (véanse, p. ej., la Patente de EE. UU. 5.648.260, Kontermann y Dübel (2010), *loc. cit.* y Little (2009), *loc. cit.*).

En inmunología, la maduración por afinidad es el procedimiento por el que las células B producen anticuerpos con una afinidad incrementada para un antígeno durante el transcurso de una respuesta inmunitaria. Con exposiciones repetidas al mismo antígeno, un anfitrión producirá anticuerpos de afinidades sucesivamente mayores. Como el prototipo natural, la maduración por afinidad *in vitro* se basa en los principios de mutación y selección. La maduración por afinidad *in vitro* se ha usado satisfactoriamente para optimizar anticuerpos, construcciones de anticuerpo y

fragmentos de anticuerpo. Se introducen mutaciones aleatorias dentro de las CDRs usando radiación, mutágenos químicos o PCR propensa a error. Además, la diversidad genética se puede incrementar mediante barajado de cadenas. Dos o tres rondas de mutación y selección usando métodos de despliegue como despliegue en fagos habitualmente dan como resultado fragmentos de anticuerpo con afinidades en el intervalo nanomolar bajo.

Un tipo preferido de variación por sustitución de aminoácidos de las construcciones de anticuerpo implica uno o más residuos de regiones hipervariables de un anticuerpo original (p. ej. un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para un desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo original a partir del cual se generan. Un modo conveniente de generar estas variantes por sustitución implica la maduración por afinidad usando despliegue en fagos. Brevemente, varios sitios de regiones hipervariables (p. ej. 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se presentan de un modo monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se criban a continuación con respecto a su actividad biológica (p. ej. afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. A fin de identificar posibles sitios de regiones hipervariables para la modificación, se puede realizar mutagénesis por escaneo de alanina para identificar residuos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el dominio de unión y, p. ej., CDH19 humano. Estos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan estas variantes, el conjunto de variantes se somete a cribado según se describe en el presente documento y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes se pueden seleccionar para un desarrollo adicional.

Un anticuerpo, una construcción de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo también se puede modificar mediante eliminación específica de epítomos de células T humanas (un método llamado "desinmunización") mediante los métodos divulgados en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317. Brevemente, los dominios variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo se pueden analizar con respecto a péptidos que se unen al MHC clase II; estos péptidos representan epítomos de células T potenciales (según se define en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de epítomos de células T potenciales, se puede aplicar un enfoque de modelado informático denominado "enhebrado de péptidos", y además una base de datos de péptidos que se unen al MHC clase II humano se puede consultar con respecto a motivos presentes en las secuencias de VH y VL, según se describe en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos motivos se unen a cualquiera de los 18 principales alotipos DR del MHC clase II, y así constituyen epítomos de células T potenciales. Los epítomos de células T potenciales detectados se pueden eliminar al sustituir pequeños números de residuos de aminoácido en los dominios variables o, preferiblemente, mediante sustituciones de aminoácidos individuales. Típicamente, se realizan sustituciones conservativas. A menudo, pero no exclusivamente, se puede usar un aminoácido común a una posición en secuencias de anticuerpo de la línea germinal humana. Secuencias de la línea germinal humana se divulgan, p. ej., en Tomlinson, y cols. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G.P. y cols. (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; y Tomlinson y cols. (1995) EMBO J. 14: 14:4628-4638. El directorio V BASE proporciona un directorio exhaustivo de secuencias de regiones variables de inmunoglobulinas humanas (compiladas por Tomlinson, LA. y cols. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, RU). Estas secuencias se pueden usar como una fuente de secuencia humana, p. ej., para regiones de armazón y CDRs. También se pueden usar regiones de armazón humanas de consenso, por ejemplo según se describe en la Patente de EE. UU. Nº 6.300.064.

Los anticuerpos, las construcciones de anticuerpo o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras secuencias que se unen a antígeno de anticuerpos) "humanizados" son anticuerpos o inmunoglobulinas de secuencias principalmente humanas, que contienen (a) una secuencias o secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas (anticuerpo del receptor) humanas en las que residuos procedentes de una región hipervariable (también CDR) del receptor se reemplazan por residuos procedentes de una región hipervariable de una especie no humana (p. ej., roedor) (anticuerpo del donante) tal como ratón, rata, hámster o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de la región de armazón (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los "anticuerpos humanizados" según se usa en el presente documento también pueden comprender residuos que no se encuentran no en el anticuerpo del receptor ni en el anticuerpo del donante. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar más el rendimiento del anticuerpo. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones y cols., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann y cols., Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

Los anticuerpos humanizados o sus fragmentos se pueden generar al reemplazar secuencias del dominio variable Fv que no están directamente implicadas en la unión a antígeno con secuencias equivalentes procedentes de dominios variables Fv humanos. Métodos ejemplares para generar anticuerpos humanizados o sus fragmentos son proporcionados por Morrison (1985) Science 229:1202-1207; por Oi y cols. (1986) BioTechniques 4:214; y por los documentos US 5.585.089, US 5.693.761, US 5.693.762, US 5.859.205 y US 6.407.213. Esos métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican la totalidad o parte de los dominios variables Fv de inmunoglobulina procedentes de al menos una de una cadena pesada o ligera. Estos ácidos nucleicos se pueden

obtener a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo contra una diana predeterminada, según se describe anteriormente, así como a partir de otras fuentes. El ADN recombinante que codifica la molécula de anticuerpo humanizado se puede clonar a continuación en un vector de expresión apropiado.

También se pueden producir anticuerpos humanizados usando animales transgénicos tales como ratones que expresan genes de la cadena pesada y ligera humana, pero son incapaces de expresar los genes de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de ratón endógena. Winter describe un método de injerto de CDR ejemplar que se puede usar para preparar los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento (Patente de EE. UU. N° 5.225.539). Todas las CDRs de un anticuerpo humano particular se pueden reemplazar por al menos una porción de una CDR no humana, o solo algunas de las CDRs se pueden reemplazar por CDRs no humanas. Solo es necesario reemplazar el número de CDRs requerido para la unión del anticuerpo humanizado a un antígeno predeterminado.

Un anticuerpo humanizado se puede optimizar mediante la introducción de sustituciones conservativas, sustituciones de secuencias de consenso, sustituciones de la línea germinal y/o retromutaciones. Estas moléculas de inmunoglobulina alteradas se pueden elaborar mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en la técnica, (p. ej., Teng y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor y cols., Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson y cols., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982, y el documento EP 239 400.

El término "anticuerpo humano", "construcción de anticuerpo humano" y "dominio de unión humano" incluye anticuerpos, construcciones de anticuerpo y dominios de unión que tienen regiones de anticuerpo tales como regiones o dominios variables y constantes que corresponden sustancialmente a secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, las descritas por Kabat y cols. (1991) (*loc. cit.*). Los anticuerpos, las construcciones de anticuerpo o los dominios de unión humanos pueden tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o más posiciones reemplazadas por un residuo de aminoácido que no es codificado por la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana. La definición de anticuerpos, construcciones de anticuerpo y dominios de unión humanos que se usa en el presente documento también contempla anticuerpos totalmente humanos, que incluyen solo secuencias humanas no alteradas artificialmente y/o genéticamente de anticuerpos como los que se pueden derivar al usar tecnologías o sistemas tales como el Xenomouse.

En algunas realizaciones, las construcciones de anticuerpo de la invención son construcciones de anticuerpo "aisladas" o "sustancialmente puras". "Aislada" o "sustancialmente pura" cuando se usa para describir la construcción de anticuerpo divulgada en el presente documento significa una construcción de anticuerpo que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno de producción. Preferiblemente, la construcción de anticuerpo está libre o sustancialmente libre de asociación con todos los demás componentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tales como los que resultan de células transfectadas recombinantes, son materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. Las construcciones de anticuerpo pueden constituir, p. ej., al menos alrededor de 5%, o al menos alrededor de 50% en peso de la proteína total en una muestra dada. Se entiende que la proteína aislada puede constituir de 5% a 99,9% en peso del contenido de proteína total, dependiendo de las circunstancias. El polipéptido se puede elaborar en una concentración significativamente superior a través del uso de un promotor inducible o un promotor de alta expresión, de modo que se elabore a niveles de concentración incrementados. La definición incluye la producción de una construcción de anticuerpo en una amplia variedad de organismos y/o células anfitrionas que son conocidos en la técnica. En realizaciones preferidas, la construcción de anticuerpo se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de vaso giratorio, o (2) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. Ordinariamente, sin embargo, una construcción de anticuerpo aislada se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

El término "dominio de unión" caracteriza en relación con la presente invención un dominio que se une (específicamente) a / interactúa con / reconoce un epítipo diana dado o un sitio diana dado sobre las moléculas (antígenos) diana CDH19 y CD3, respectivamente. La estructura y la función del primer dominio de unión (que reconoce CDH19) y también la estructura y/o la función del segundo dominio de unión (CD3) se basa o se basan en la estructura y/o la función de un anticuerpo, p. ej. de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o entera. Según la invención, el primer dominio de unión se caracteriza según se define en las reivindicaciones adjuntas. El segundo dominio de unión también comprende los requisitos estructurales mínimos de un anticuerpo que permitan la unión a la diana. El segundo dominio de unión se caracteriza según se define en las reivindicaciones. Se prevé que el primer y/o segundo dominio de unión se produzca mediante o sea obtenible mediante métodos de despliegue en fagos o cribado de bibliotecas en lugar de al injertar secuencias de CDR procedentes de un anticuerpo (monoclonal) preexistente en un andamiaje.

Según la presente invención, los dominios de unión de la invención están en forma de polipéptidos como los definidos en las reivindicaciones adjuntas. Estos polipéptidos pueden incluir partes proteínicas y partes no proteínicas (p. ej. ligadores químicos o agentes de reticulación química tales como glutaraldehído). Las proteínas (incluyendo sus fragmentos, preferiblemente fragmentos biológicamente activos, y péptidos, que tienen habitualmente menos de 30 aminoácidos) comprenden dos o más aminoácidos acoplados entre sí a través de un enlace peptídico covalente (dando como resultado una cadena de aminoácidos). El término "polipéptido" según se usa en el presente documento

describe un grupo de moléculas, que habitualmente consisten en más de 30 aminoácidos. Los polipéptidos pueden formar además multímeros tales como dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir que consisten en más de una molécula de polipéptido. Las moléculas de polipéptido que forman estos dímeros, trímeros, etc. pueden ser idénticas o no idénticas. Las estructuras de orden superior correspondientes de estos multímeros se denominan, por consiguiente, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros etc. Un ejemplo de un heteromultímero es una molécula de anticuerpo que, en su forma presente en la naturaleza, consiste en dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas y dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas. Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" también se refieren a péptidos / polipéptidos / proteínas modificados naturalmente en los que la modificación se efectúa p. ej. mediante modificaciones postraduccionales como glucosilación, acetilación, fosforilación y similares. Un "péptido", "polipéptido" o "proteína" cuando se menciona en el presente documento también puede ser uno químicamente modificado tal como pegilado. Estas modificaciones son muy conocidas en la técnica y se describen en el presente documento posteriormente.

Según se menciona anteriormente, una dominio de unión puede comprender típicamente una región variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH); sin embargo, no tienen que comprender ambas. Los fragmentos Fd, por ejemplo, tienen dos regiones VH y a menudo retienen algo de la función de unión a antígeno del dominio de unión a antígeno intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno (modificados) incluyen (1) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que tiene los dominios VL, VH, CL y CH1; (2) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab ligados mediante un puente de disulfuro en la región de bisagra; (3) un fragmento Fd que tiene los dos dominios VH y CH1; (4) un fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (5) un fragmento dAb (Ward y cols., (1989) Nature 341 :544-546), que tiene un dominio VH; (6) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, y (7) un Fv monocatenario (scFv), prefiriéndose el último (por ejemplo, derivado de una biblioteca de scFv).

Los anticuerpos y construcciones de anticuerpo que comprenden al menos un dominio de unión humano evitan algunos de los problemas asociados con anticuerpos o construcciones de anticuerpo que poseen regiones variables y/o constantes no humanas, tales como de roedor (p. ej. murinas, rata, hámster o conejo). La presencia de estas proteínas derivadas de roedores puede conducir a la depuración rápida de los anticuerpos o construcciones de anticuerpo o pueden conducir a la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo o la construcción de anticuerpo por un paciente. A fin de evitar el uso de anticuerpos o construcciones de anticuerpo derivados de roedor, se pueden generar anticuerpos / construcciones de anticuerpo humanos o totalmente humanos a través de la introducción de la función de anticuerpo humano en un roedor de modo que el roedor produzca anticuerpos totalmente humanos.

La capacidad para clonar y reconstruir locus humanos de megabases de tamaño en YAC y para introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un enfoque potente para elucidar los componentes funcionales de locus muy grandes o cartografiados en bruto así como para generar modelos útiles de enfermedad humana. Además, el uso de esta tecnología para la sustitución de locus de ratón por sus equivalentes humanos podría proporcionar conocimientos únicos en la expresión y la regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas y su implicación en la inducción y la progresión de enfermedades.

Una importante aplicación práctica de esta estrategia es la "humanización" del sistema inmunitario humoral del ratón. La introducción de locus de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en los que los genes de Ig endógenos se han inactivado ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos que subyacen a la expresión y el montaje programados de anticuerpos así como su papel en el desarrollo de células B. Además, esta estrategia podría proporcionar una fuente ideal para la producción de anticuerpos monoclonales (mAbs) totalmente humanos – un hito importante para cumplir la promesa de una terapia con anticuerpo en la enfermedad humana. Se espera que los anticuerpos o las construcciones de anticuerpo totalmente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a mAbs de ratón o derivados de ratón y así incrementen la eficacia y la seguridad de los anticuerpos / las construcciones de anticuerpo administrados. Se puede esperar que el uso de anticuerpos o construcciones de anticuerpo totalmente humanos proporcione una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como inflamación, autoinmunidad y cáncer, que requieren administraciones de compuestos repetidas.

Un enfoque hacia este objetivo era manipular cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los locus de Ig humana por anticipado de modo que estos ratones produjeran un gran repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los fragmentos de Ig humana grandes conservarían la gran diversidad génica variable así como la regulación apropiada de la producción y expresión de anticuerpos. Al explotar la maquinaria del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducido en estas cepas de ratón daría anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Usando la tecnología de los hibridomas, se podrían producir y seleccionar fácilmente mAb humanos específicos para antígeno con la especificidad deseada. Esta estrategia general se demostró en relación con la generación de las primeras cepas de ratón XenoMouse (véase Green y cols. Nature Genetics 7:13-21 (1994)). Las cepas XenoMouse se manipularon con cromosomas artificiales de levadura (YAC) que contenían fragmentos de configuración de la línea germinal de 245 kb y 190 kb de tamaño del locus de la cadena pesada y el locus de la cadena ligera kappa humanos, respectivamente, que contenían secuencias de la región variable y constante centrales. Los YAC que contienen Ig humana resultaron ser compatibles con el sistema de ratón tanto para la reordenación como para la expresión de anticuerpos y eran

capaces de sustituir los genes de Ig de ratón inactivados. Esto se demostró por su capacidad para inducir el desarrollo de células B, para producir un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos totalmente humanos y para generar mAb humanos específicos de antígeno. Estos resultados también sugerían que la introducción de porciones mayores de los locus de Ig humana que contenían números mayores de genes V, elementos reguladores adicionales y regiones constantes de Ig humana podría recapitular sustancialmente todo el repertorio que es característico de la respuesta humoral humana a la infección y la inmunización. El trabajo de Green y cols. se extendió recientemente a la introducción de más de aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpos humanos a través de la introducción de fragmentos de YAC de configuración de la línea germinal de megabases de tamaño de los locus de la cadena pesada y los locus de la cadena ligera kappa humanos, respectivamente. Véase Mendez y cols. Nature Genetics 15:146-156 (1997) y la solicitud de patente de EE. UU. N° Ser. 08/759.620.

La producción de los ratones XenoMouse se analiza y precisa adicionalmente el las solicitudes de patente de EE. UU. N° Ser. 07/466.008, N° Ser. 07/610.515, N° Ser. 07/919.297, N° Ser. 07/922.649, N° Ser. 08/031.801, N° Ser. 08/112.848, N° Ser. 08/234.145, N° Ser. 08/376.279, N° Ser. 08/430.938, N° Ser. 08/464.584, N° Ser. 08/464.582, N° Ser. 08/463.191, N° Ser. 08/462.837, N° Ser. 08/486.853, N° Ser. 08/486.857, N° Ser. 08/486.859, N° Ser. 08/462.513, N° Ser. 08/724.752 y N° Ser. 08/759.620; y las Pat. EE. UU. N° 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181 y 5.939.598 y las Patentes Japonesas N° 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2. Véanse además Mendez y cols. Nature Genetics 15:146-156 (1997) y Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), los documentos EP 0 463 151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 y WO 03/47336.

En un enfoque alternativo, otros, incluyendo GenPharm International, Inc., han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, un locus de Ig exógeno se imita a través de la inclusión de trozos (genes individuales) procedentes del locus de Ig. Así, uno o más genes de VH, uno o más genes de DH, uno o más genes de JH, una región constante mu y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) se forman en una construcción para la inserción en un animal. Este enfoque se describe en la Pat. EE. UU. N° 5.545.807 de Surani y cols. y las Pat. EE. UU. N° 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.877.397, 5.874.299 y 6.255.458, cada una de Lonberg y Kay, las Pat. EE. UU. N° 5.591.669 y 6.023.010 de Krimpenfort y Berns, las Pat. EE. UU. N° 5.612.205, 5.721.367 y 5.789.215 de Berns y cols., y la Pat. EE. UU. N° 5.643.763 de Choi y Dunn, y las solicitudes de patente de EE. UU. internacionales de GenPharm N° Ser. 07/574.748, N° Ser. 07/575.962, N° Ser. 07/810.279, N° Ser. 07/853.408, N° Ser. 07/904.068, N° Ser. 07/990.860, N° Ser. 08/053.131, N° Ser. 08/096.762, N° Ser. 08/155.301, N° Ser. 08/161.739, N° Ser. 08/165.699, N° Ser. 08/209.741. Véanse además los documentos EP 0 546 073 B1, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 y WO 98/24884 y la Pat. EE. UU. N° 5.981.175. Véanse también Taylor y cols. (1992), Chen y cols. (1993), Tuailon y cols. (1993), Choi y cols. (1993), Lonberg y cols. (1994), Taylor y cols. (1994), and Tuailon y cols. (1995), Fishwild y cols. (1996).

Kirin también ha demostrado la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los que, a través de fusión microcelular, se han introducido grandes trozos de cromosomas, o cromosomas enteros. Véanse las Solicitudes de Patente Europea N° 773 288 y 843 961. Xenerex Biosciences está desarrollando una tecnología para la generación potencial de anticuerpos humanos. En esta tecnología, ratones SCID se reconstituyen con células linfáticas humanas, p. ej., células B y/o T. A continuación, los ratones se inmunizan con un antígeno y pueden generar una respuesta inmunitaria contra el antígeno. Véanse las Pat. EE. UU. N° 5.476.996, 5.698.767 y 5.958.765.

Las respuestas de anticuerpos humanos antimurinos (HAMA) han conducido a la industria a preparar anticuerpos quiméricos o humanizados de otro modo. Sin embargo, se espera que se observen ciertas respuestas de anticuerpos humanos anti quiméricos (HACA), particularmente en utilización crónicas o de múltiples dosis del anticuerpo. Así, sería deseable proporcionar construcciones de anticuerpo que comprendieron un dominio de unión totalmente humano contra CDH19 y un dominio de unión totalmente humano contra CD3 a fin de invalidar problemas y/o efectos de la respuesta de HAMA o HACA.

Los términos "se une (específicamente) a", "reconoce (específicamente)", "se dirige (específicamente) a" y "reacciona (específicamente) con" significan según esta invención que un dominio de unión interactúa o interactúa específicamente con uno o más, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres y lo más preferiblemente al menos cuatro aminoácidos de un epítipo situado sobre la proteína o el antígeno diana (CDH19 / CD3).

El término "epítipo" se refiere a un sitio de un antígeno al se une específicamente un dominio de unión, tal como un anticuerpo o una inmunoglobulina o un derivado o fragmento de un anticuerpo o de una inmunoglobulina. Un "epítipo" es antigénico y así el término epítipo también se menciona a veces en el presente documento como "estructura antigénica" o "determinante antigénico". Así, el dominio de unión es un "sitio de interacción con antígeno". También se entiende que dicha unión/interacción define un "reconocimiento específico".

Los "epítopos" pueden estar formado tanto por aminoácidos contiguos como por aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Un "epítipo lineal" es un epítipo en el que una secuencia primaria de aminoácidos comprende el epítipo reconocido. Un epítipo lineal incluye típicamente al menos 3 o al menos 4, y más habitualmente al menos 5 o al menos 6 o al menos 7, por ejemplo, de alrededor de 8 a alrededor de 10 aminoácidos en una secuencia única.

Un "epítipo de conformación", en contraste con un epítipo lineal, es un epítipo en el que la secuencia primaria de los aminoácidos que comprenden el epítipo no son el único componente definitorio del epítipo reconocido (p. ej., un epítipo en el que la secuencia primaria de aminoácidos no es necesariamente reconocida por el dominio de unión). Típicamente, un epítipo de conformación comprende un número incrementado de aminoácidos con relación a un epítipo lineal. Con respecto al reconocimiento de epítipos de conformación, el dominio de unión reconoce una estructura tridimensional del antígeno, preferiblemente un péptido o proteína o uno de sus fragmentos (en el contexto de la presente invención, el antígeno para uno de los dominios de unión está comprendido dentro de la proteína CDH19). Por ejemplo, cuando una proteína se pliega para formar una estructura tridimensional, ciertos aminoácidos y/o el esqueleto del polipéptido que forman el epítipo de conformación se yuxtaponen permitiendo que el anticuerpo reconozca el epítipo. Métodos para determinar la conformación de epítipos incluyen, pero no se limitan a, cristalografía de rayos X, espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional (2D-NMR) y etiquetado de espín localizado y espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR).

Los ejemplos proporcionados describen un método adicional para caracterizar un dominio de unión dado, que incluye una prueba sobre si el dominio de unión dado se une a una o más agrupaciones de epítipos de una proteína dada, en particular CDH19.

Según se usa en el presente documento, el término "agrupación de epítipos" indica la totalidad de epítipos que se encuentran en un tramo contiguo definido de un antígeno. Una agrupación de epítipos puede comprender uno, dos o más epítipos. El concepto de "agrupaciones de epítipos" también se usa en la caracterización de las particularidades de las construcciones de anticuerpo de la invención. Las agrupaciones de epítipos que se definían – en el contexto de la presente invención – en el dominio extracelular de CDH 19 se describen anteriormente y se representan en la Figura 5.

Cuando una agrupación de epítipos en la proteína CDH19 humana se intercambia por la agrupación de epítipos respectiva de un antígeno CDH19 de pollo (dando como resultado una construcción que comprende CDH19 humano, donde una agrupación de epítipos humana se reemplaza por su agrupación de epítipos de pollo homóloga), se producirá una disminución en la unión del dominio de unión. Dicha disminución es preferiblemente al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%; más preferiblemente al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o incluso 100% en comparación con la respectiva agrupación de epítipos en la proteína CDH19 humana, con lo que se establece que la respectiva agrupación de epítipos en la proteína CDH19 humana sea 100%. Se prevé que las susodichas quimeras de CDH19 humano / CDH19 de pollo se expresen en células CHO. También se prevé que las quimeras de CDH19 humano / CDH19 de pollo se fusionen con un dominio transmembranario y/o un dominio citoplásmico de una proteína unida a membrana diferente, tal como EpCAM.

Un método para probar esta pérdida de unión debida al intercambio por la respectiva agrupación de epítipos de un antígeno CDH19 no humano (p. ej. de pollo, pero también podrían concebirse otros como ratón, rata, hámster, conejo, etc.) se describe en los Ejemplos 3. Un método adicional para determinar la contribución de un residuo específico de un antígeno diana al reconocimiento por una construcción de anticuerpo o un dominio de unión es el escaneo de alanina (véase, p. ej., Morrison KL & Weiss GA. Cur Opin Chem Biol. junio de 2001;5(3):302-7), donde cada residuo que se va a analizar se reemplaza por alanina, p. ej. a través de mutagénesis dirigida. La alanina se usa debido a su grupo funcional metilo químicamente inerte no voluminoso que sin embargo imita las referencias de estructura secundaria que poseen muchos de los otros aminoácidos. A veces, se pueden usar aminoácidos voluminosos tales como valina o leucina en casos en los que se desee la conservación del tamaño de residuos mutados. El escaneo de alanina es una tecnología madura que se ha usado durante mucho tiempo.

La interacción entre el dominio de unión y el epítipo o agrupación de epítipos implica que un dominio de unión exhiba afinidad apreciable por el epítipo o agrupación de epítipos sobre una proteína o antígeno particular (aquí: CDH19 y CD3, respectivamente) y, generalmente, no exhiba reactividad significativa con proteínas o antígenos distintos de CDH19 o CD3. "Afinidad apreciable" incluye la unión con una afinidad de alrededor de 10^{-6} M (KD) o más fuerte. Preferiblemente, la unión se considera específica cuando la afinidad de unión es de alrededor de 10^{-12} a 10^{-8} M, 10^{-12} a 10^{-9} M, 10^{-12} a 10^{-10} M, 10^{-11} a 10^{-8} M, preferiblemente de alrededor de 10^{-11} a 10^{-9} M. Si un dominio de unión específicamente reacciona con o se une específicamente a una diana se puede probar fácilmente al, entre otras cosas, comparar la reacción de dicho dominio de unión con una proteína o antígeno diana con la reacción de dicho dominio de unión con proteínas o antígenos distintos de CDH19 o CD3. Preferiblemente, un dominio de unión de la invención no se une esencialmente o sustancialmente a proteínas o antígenos distintos de CDH19 o CD3 (es decir, el primer dominio de unión no es capaz de unirse a proteínas distintas de CDH19 y el segundo dominio de unión no es capaz de unirse a proteínas distintas de CD3).

El término "no se une esencialmente / sustancialmente" o "no es capaz de unirse" significa que un dominio de unión de la presente invención no se une a una proteína o antígeno distinto de CDH19 o CD3, es decir, no muestra una reactividad de más de 30%, preferiblemente no más de 20%, más preferiblemente no más de 10%, particularmente no más de 9%, 8%, 7%, 6% o 5% con proteínas o antígenos distintos de CDH19 o CD3, con lo que la unión a CDH19 o CD3, respectivamente, se fija al 100%.

Se cree que la unión específica es efectuada por motivos específicos en la secuencia de aminoácidos del dominio de unión y el antígeno. Así, la unión se consigue como resultado de su estructura primaria, secundaria y/o terciaria así

como resultado de modificaciones secundarias de dichas estructuras. La interacción específica del sitio de interacción con antígeno con su antígeno específico puede dar como resultado una simple unión de dicho sitio al antígeno. Por otra parte, la interacción específica del sitio de interacción con antígeno con su antígeno específico puede dar como resultado alternativamente o adicionalmente el inicio de una señal, p. ej., debido a la inducción de un cambio de la conformación del antígeno, una oligomerización del antígeno, etc.

El término "variable" se refiere a las porciones de los dominios del anticuerpo o la inmunoglobulina que exhiben variabilidad en su secuencia y que están implicadas en la determinación de la especificidad y la afinidad de unión de un anticuerpo particular (es decir, "el dominio o los dominios variables"). El apareamiento entre sí de una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL) forma un solo sitio de unión a antígeno. El dominio CH más proximal a VH se denomina CH1. Cada cadena ligera (L) está ligada a una cadena pesada (H) mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están ligadas entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotopo de las cadenas H.

La variabilidad no está uniformemente distribuida a través de los dominios variables de anticuerpos; se concentra en subdominios de cada una de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. Estos subdominios se denominan "regiones hipervariables" o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDRs). Las porciones más conservadas (es decir, no hipervariables) de los dominios variables se denominan las regiones de "armazón" (FRM) y proporcionan un andamiaje para las seis CDR en el espacio tridimensional para formar una superficie de unión a antígeno. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras presentes en la naturaleza comprenden cada uno cuatro regiones FRM (FR1, FR2, FR3 y FR4), que adoptan fundamentalmente una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos caso forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante la FRM y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno (véase Kabat y cols., *loc. cit.*). Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión al antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos y activación del complemento.

Los términos "CDR", y su plural "CDRs", se refieren a la región determinante de la complementariedad de las que tres constituyen el carácter de unión de una región variable de cadena ligera (CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3) y tres constituyen el carácter de unión de una región variable de cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3). Las CDRs contienen la mayoría de los residuos responsables de interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno y de ahí que contribuyan a la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: son los principales determinantes de la especificidad para un antígeno.

Los límites y las longitudes definitorios exactos de las CDRs están sometidos a diferentes sistemas de clasificación y numeración. Por lo tanto, se puede hacer referencia a las CDRs mediante Kabat, Chothia, contacto u otras definiciones de límites, incluyendo el sistema de numeración descrito en el presente documento. A pesar de los diferentes límites, cada uno de estos sistemas tiene algún grado de solapamiento en lo que constituye las llamadas "regiones hipervariables" dentro de las secuencias variables. Por lo tanto, las definiciones de CDR según estos sistemas pueden diferir en longitud y zonas de los límites con respecto a la región de armazón adyacente. Véanse, por ejemplo, Kabat (un enfoque basado en la variabilidad de secuencia de especies cruzadas), Chothia (un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos de antígeno-anticuerpo) y/o MacCallum (Kabat y cols., *loc. cit.*; Chothia y cols., J. Mol. Biol., 1987, 196: 901-917; y MacCallum y cols., J. Mol. Biol., 1996, 262: 732). Otro patrón más para caracterizar el sitio de unión a antígeno es la definición de AbM usada por el programa de modelación de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Véase, p. ej., Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). En la medida en que dos técnicas de identificación de residuos definan regiones de solapamiento, pero no regiones idénticas, se pueden combinar para definir una CDR híbrida. Sin embargo, se prefiere la numeración según el llamado sistema de Kabat.

Típicamente, las CDRs forman una estructura de bucle que se puede clasificar como una estructura canónica. El término "estructura canónica" se refiere a la principal conformación de cadena que es adoptada por los bucles de unión a antígeno (CDR). A partir de estudios estructurales comparativos, se ha encontrado que cinco de los seis bucles de unión a antígeno tienen solo un repertorio limitado de conformaciones disponibles. Cada estructura canónica se puede caracterizar por los ángulos de torsión del esqueleto del polipéptido. Por lo tanto, los bucles correspondientes entre anticuerpos pueden tener estructuras tridimensionales muy similares, a pesar de la alta variabilidad de la secuencia de aminoácidos en la mayoría de las partes de los bucles (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; Chothia y cols., Nature, 1989, 342: 877; Martin y Thornton, J. Mol. Biol., 1996, 263: 800). Además, existe una relación entre la estructura del bucle adoptada y las secuencias de aminoácidos que la rodean. La conformación de una clase canónica particular se determina por la longitud del bucle y los residuos de aminoácidos que residen en posiciones clave dentro del bucle, así como dentro del armazón conservado (es decir, fuera del bucle). Por lo tanto, la asignación a una clase canónica particular se puede hacer basándose en la presencia de estos residuos de aminoácido clave.

El término "estructura canónica" también puede incluir consideraciones relativas a la secuencia lineal del anticuerpo, por ejemplo, según se cataloga por Kabat (Kabat y cols., *loc. cit.*). El esquema (sistema) de numeración de Kabat es un patrón ampliamente adoptado para numerar los residuos de aminoácido de un dominio variable de anticuerpo de un modo coherente y es el esquema preferido aplicado en la presente invención como también se menciona en otras

partes en el presente documento. También se pueden usar consideraciones estructurales adicionales para determinar la estructura canónica de un anticuerpo. Por ejemplo, las diferencias no totalmente reflejadas por la numeración de Kabat se pueden describir mediante el sistema de numeración de Chothia y cols y/o revelarse mediante otras técnicas, por ejemplo, cristalografía y modelado informático bi- o tridimensional. Según esto, una secuencia de anticuerpo dada se puede situar en una clase canónica, lo que permite, entre otras cosas, identificar secuencias de bastidor apropiadas (p. ej., basándose en un deseo de incluir una variedad de estructuras canónicas en una biblioteca. Se describen en la bibliografía la numeración de Kabat de secuencias de aminoácidos de anticuerpos y consideraciones estructurales como las descritas por Chothia y cols., loc. cit. y sus implicaciones para construir aspectos canónicos de la estructura de los anticuerpos. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas en la técnica. Para una revisión de la estructura de los anticuerpos, véase Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow y cols., 1988.

La CDR3 de la cadena ligera y, particularmente, la CDR3 de la cadena pesada pueden constituir los determinantes más importantes en la unión al antígeno dentro de las regiones variables de la cadena ligera y pesada. En algunas construcciones de anticuerpo, la CDR3 de la cadena pesada parece constituir la principal superficie de contacto entre el antígeno y el anticuerpo. Se pueden usar esquemas de selección *in vitro* en los que se varía la CDR3 sola para variar las propiedades de unión de un anticuerpo o determinar qué residuos contribuyen a la unión de un antígeno. De ahí que la CDR3 sea típicamente la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión a anticuerpo. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como dos residuos de aminoácido o mayor de 26 aminoácidos.

La secuencia de genes de anticuerpo después del ensamblaje y la mutación somática es muy variada, y se estima que estos genes variados codifican 10^{10} moléculas de anticuerpo diferentes (Immunoglobulin Genes, 2ª ed., eds. Jonio y cols., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Según esto, el sistema inmunitario proporciona un repertorio de inmunoglobulinas. El término "repertorio" se refiere a al menos una secuencia nucleotídica derivada totalmente o parcialmente de al menos una secuencia que codifica al menos una inmunoglobulina. La secuencia o las secuencias se pueden generar mediante reordenación *in vivo* de los segmentos V, D y J de cadenas pesadas, y los segmentos V y J de cadenas ligeras. Alternativamente, la secuencia o las secuencias se pueden generar a partir de una célula en respuesta a la cual se produce la reordenación, p. ej., estimulación *in vitro*. Alternativamente, parte o la totalidad de la secuencia o secuencias se pueden obtener mediante empalme de ADN, síntesis de nucleótidos, mutagénesis y otros métodos, véase, p. ej., la Patente EE. UU. 5.565.332. Un repertorio puede incluir una sola secuencia o puede incluir una pluralidad de secuencias, incluyendo las de una colección genéticamente diversa.

En la construcción de anticuerpo de la invención, el primer dominio de unión comprende una región VH y una región VL seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) pares de una región VH y una región VL según se representa en SEQ ID NO: 21+23, SEQ ID NO: 34+36, SEQ ID NO: 73+75, SEQ ID NO: 86+88, SEQ ID NO: 99+101, SEQ ID NO: 112+114, SEQ ID NO: 125+127, SEQ ID NO: 138+140, SEQ ID NO: 164+166, SEQ ID NO: 177+179, SEQ ID NO: 190+192, SEQ ID NO: 229+231, SEQ ID NO: 281+283, SEQ ID NO: 294+296, SEQ ID NO: 307+309, SEQ ID NO: 320+322, SEQ ID NO: 515+517, SEQ ID NO: 528+530, SEQ ID NO: 541+543, SEQ ID NO: 554+556 y SEQ ID NO: 580+582; and

(b) pares de una región VH y una región VL según se representa en SEQ ID NO: 8+10, SEQ ID NO: 333+335, SEQ ID NO: 346+348, SEQ ID NO: 385+387, SEQ ID NO: 398+400, SEQ ID NO: 424+426, SEQ ID NO: 437+439, SEQ ID NO: 476+478, SEQ ID NO: 502+504 y SEQ ID NO: 606+608.

Los primeros dominios de unión especificados anteriormente (que comprenden pares de una región VH y un región VL) que pertenecen al punto o grupo (a) se caracterizan todos como dominios de unión que reconocen específicamente la agrupación de epítomos 1 de CDH19, mientras que los primeros dominios de unión especificados anteriormente (que comprenden pares de una región VH y una región VL) que pertenecen al punto o grupo (b) se caracterizan todos como dominios de unión que reconocen específicamente la agrupación de epítomos 3 de CDH19.

El término "bienespecifica" según se usa en el presente documento se refiere a una construcción de anticuerpo que es "al menos bienespecifica", es decir, comprende al menos un primer dominio de unión y un segundo dominio de unión, donde el primer dominio de unión se une a un antígeno o diana (aquí: CDH19), y el segundo dominio de unión se une a otro antígeno o diana (aquí: CD3). Según esto, las construcciones de anticuerpo según la invención comprenden especificidades para al menos dos antígenos o dianas diferentes. El término "construcción de anticuerpo bienespecifica" de la invención también abarca construcciones de anticuerpo multiespecíficas tales como construcciones de anticuerpo triespecíficas, incluyendo las últimas tres dominios de unión, o construcciones que tienen más de tres (p. ej. cuatro, cinco...) especificidades.

Dado que las construcciones de anticuerpo según la invención son (al menos) bienespecíficas, no se presentan en la naturaleza y son notablemente diferentes de los productos presentes en la naturaleza. Una construcción de anticuerpo o inmunoglobulina "bienespecifica" es de ahí un anticuerpo o inmunoglobulina híbrido artificial que tiene al menos dos sitios de unión distintos con diferentes especificidades. Los anticuerpos bienespecíficos se pueden producir mediante una variedad de métodos incluyendo la fusión de hibridomas o la ligazón de fragmentos Fab'. Véase, p. ej., Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990).

Los al menos dos dominios de unión y los dominios variables de la construcción de anticuerpo de la presente invención comprenden ligadores peptídicos (péptidos espaciadores). El término "ligador peptídico" define según la presente invención una secuencia de aminoácidos por la que las secuencias de aminoácidos de un dominio (variable y/o de unión) y otro dominio (variable y/o de unión) de la construcción de anticuerpo de la invención se ligan entre sí. Una particularidad técnica esencial de este ligador peptídico es que dicho ligador peptídico no comprende actividad de polimerización. Entre los ligadores peptídicos adecuados están los descritos en las Patentes de EE. UU. 4.751.180 y 4.935.233 o el documento WO 88/09344.

En caso de que se use un ligador, este ligador es preferiblemente de una longitud y secuencia suficientes para asegurar que cada uno de los dominios primero y segundo puedan, independientemente uno de otro, retener sus especificidades de unión diferenciales. Para ligadores peptídicos que conectan los al menos dos dominios de unión en la construcción de anticuerpo de la invención (o dos dominios variables), se prefieren los ligadores peptídicos que comprenden solo un pequeño número de residuos de aminoácido, p. ej. 12 residuos de aminoácido o menos. Así, se prefiere un ligador peptídico de 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 residuos de aminoácido. Un ligador peptídico previsto con menos de 5 aminoácidos comprende 4, 3, 2 o un aminoácidos donde se prefieren los ligadores ricos en Gly. Una aminoácido "individual" particularmente preferido en el contexto de dicho "ligador peptídico" es Gly. Según esto, dicho ligador peptídico puede consistir en el aminoácido individual Gly. Otra realización preferida de un ligador peptídico se caracteriza por la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, es decir Gly₄Ser, o sus polímeros, es decir (Gly₄Ser)_x, donde x es un número entero de 1 o más. Las características de dicho ligador peptídico, que comprenden la ausencia de la promoción de estructuras secundarias, se conocen en la técnica y se describen, p. ej., en Dall'Acqua y cols. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle y cols. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) y Raag y Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Se prefieren ligadores peptídicos que tampoco promuevan estructuras secundarias. La ligazón de dichos dominios entre sí se puede proporcionar, p. ej., mediante manipulación genética, según se describe en los ejemplos. Métodos para preparar construcciones monocatenarias biespecíficas fusionadas y ligadas operativamente y expresarlas en células de mamífero o bacterias son bien conocidos en la técnica (p. ej. el documento WO 99/54440 o Sambrook y cols., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001).

De ahí que la invención proporcione una construcción de anticuerpo que está en el formato (scFv)₂.

La construcción de anticuerpo de la invención es un "Fv monocatenario" (scFv) biespecífico. Aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes separados, pueden estar enlazados, usando métodos recombinantes, por un ligador sintético que permita elaborarlos como un cadena proteínica simple en la que las regiones VL y VH se aparean para formar una molécula monovalente; véase, p. ej., Huston y cols. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentes se evalúan con respecto a la función del mismo modo que los anticuerpos enteros o de longitud completa. De ahí que un fragmento variable monocatenario (scFv) sea una proteína de fusión de la región variable de la cadena pesada (VH) y de la cadena ligera (VL) de inmunoglobulinas, habitualmente conectadas con un péptido ligador corto de alrededor de diez a alrededor de 25 aminoácidos, preferiblemente de alrededor de 15 a 20 aminoácidos. Habitualmente, el ligador es rico en glicina para la flexibilidad, así como serina o treonina para la solubilidad, y puede conectar el extremo N de la VH con el extremo C de la VL o viceversa. Esta proteína retiene la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la retirada de las regiones constantes y la introducción del ligador.

Las moléculas monocatenarias biespecíficas son conocidas en la técnica y se describen en el documento WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véanse, entre otros, la Patente de EE. UU. 4.946.778, Kontermann y Dübel (2010), *loc. cit.* y Little (2009), *loc. cit.*) se pueden adaptar para producir construcciones de anticuerpo monocatenarias que reconocen específicamente una diana o dianas elegidas.

Los fragmentos variables monocatenarios bivalentes (también denominados divalentes) o biespecíficos (bi-scFvs o di-scFvs que tienen el formato (scFv)₂) se pueden manipular ligando dos moléculas de scFv. Si estas dos moléculas de scFv tienen la misma especificidad de unión, la molécula de (scFv)₂ resultante se denominará preferiblemente bivalente (es decir, tiene dos valencias para el mismo epítipo diana). Si las dos moléculas de scFv tienen diferentes especificidades de unión, la molécula de (scFv)₂ resultante se denominará preferiblemente biespecífica. La ligazón se puede realizar al producir una sola cadena peptídica con dos regiones VH y dos regiones VL, dando scFvs en tándem (véase, p. ej., Kufer P. y cols., (2004) Trends in Biotechnology 22(5):238-244). Otra posibilidad es la creación de moléculas de scFv con péptidos ligadores que sean demasiado cortos para que las dos regiones variables se plieguen entre sí (p. ej. alrededor de cinco aminoácidos), forzando a los scFvs a dimerizarse. Este tipo se conoce como diacuerpos (véase, p. ej., Hollinger, Philipp y cols., (julio de 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8.).

Los anticuerpos de un solo dominio comprenden meramente un dominio variable de anticuerpo (monomérico) que es capaz de unirse selectivamente a un antígeno específico, independientemente de otras regiones o dominios V. Los primeros anticuerpos de un solo dominio se manipularon a partir de anticuerpos de cadena pesada encontrado en

camélidos, y estos se denominan fragmentos V_HH. Los peces cartilaginosos también pueden tener anticuerpos de cadena pesada (IgNAR) de los que pueden obtenerse anticuerpos de un solo dominio denominados fragmentos V_{NAR}. Un enfoque alternativo es separar los dominios variables dímeros de inmunoglobulinas comunes, p. ej. procedentes de seres humanos o roedores, en monómeros, obteniendo de ahí V_H o V_L como un Ab de un solo dominio. Aunque la mayoría de la investigación sobre anticuerpos de un solo dominio se basa actualmente en dominios variables de la cadena pesada, también se ha mostrado que nanocuerpos derivados de cadenas ligeras se unen específicamente a epítomos diana. Ejemplos de anticuerpos de un solo dominio se denominan sdAb, nanocuerpos o anticuerpos de un solo dominio variable.

De ahí que un (mAb de un solo dominio)₂ sea una construcción de anticuerpo monoclonal compuesta por (al menos) dos anticuerpos monoclonales de un solo dominio, que se seleccionan individualmente del grupo que comprende V_H, V_L, V_HH y V_{NAR}. El ligador está preferiblemente en forma de un ligador peptídico. De forma similar, un "scFv-mAb de un solo dominio" es una construcción de anticuerpo monoclonal compuesta por al menos un anticuerpo de un solo dominio como el descrito anteriormente y una molécula de scFv como la descrita anteriormente. De nuevo, el ligador está preferiblemente en forma de un ligador peptídico.

En una realización, el primer dominio de unión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias que se representan en:

(a) SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 519, SEQ ID NO: 532, SEQ ID NO: 545, SEQ ID NO: 558 y SEQ ID NO: 584; y

(b) SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 350, SEQ ID NO: 389, SEQ ID NO: 402, SEQ ID NO: 428, SEQ ID NO: 441, SEQ ID NO: 480, SEQ ID NO: 506 y SEQ ID NO: 610.

Los primeros dominios de unión específicos anteriores que pertenecen al punto o grupo (a) se caracterizan todos como dominios de unión que reconocen específicamente la agrupación de epítomos 1 de CDH19, mientras que los primeros dominios de unión especificados anteriormente que pertenecen al punto o grupo (b) se caracterizan todos como dominios de unión que reconocen específicamente la agrupación de epítomos 3 de CDH19.

También se prevé que la construcción de anticuerpo de la invención tenga, además de su función para unirse a las moléculas diana CDH19 y CD3, una función adicional. En este formato, la construcción de anticuerpo es una construcción de anticuerpo trifuncional o multifuncional al dirigirse a células diana a través de la unión a CDH19, mediar en la actividad de células T citotóxicas a través de la unión a CD3 y proporcionar una función adicional tal como un dominio contante Fc totalmente funcional que media en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos a través de la incorporación de células efectoras como células NK, una etiqueta (fluorescente, etc.), un agente terapéutico tal como una toxina o un radionúclido, y/o medios para potenciar la semivida en suero, etc.

Ejemplos de medios para prolongar la semivida en suero de las construcciones de anticuerpo de la invención incluyen péptidos dominios proteínicos de proteínas, que están fusionados o enlazados de otro modo a las construcciones de anticuerpo. El grupo de péptidos incluye péptidos que se unen a otras proteínas con perfil farmacocinético preferido en el organismo humano tales como albumina sérica (véase el péptido AB156 usado en algunas construcciones de la invención) o la región constante de inmunoglobulinas (dominios Fc). Un concepto usado alternativamente de estos péptidos que prolongan la semivida incluye péptidos que se unen al receptor de Fc neonatal (FcRn), que también se usan en algunas de las construcciones de la invención. El concepto de enlazar dominios mayores de proteínas o proteínas completas incluye, p. ej., la fusión de albúmina sérica humana, variantes de albúmina sérica humana (véase el documento WO 2014/072481) o sus dominios así como la fusión de una región constante de inmunoglobulinas (dominios Fc) y sus variantes. Estas variantes de dominios Fc se pueden optimizar/modificar a fin de permitir el apareamiento deseado de dímeros o multímeros, para suprimir la unión al receptor de Fc (p. ej. receptor de th Fcy) o por otras razones. Un concepto adicional conocido en la técnica para prolongar la semivida de compuestos proteínicos pequeños en el organismo humano es la pegilación de esos compuestos, tal como la construcción de anticuerpo de la invención.

Las modificaciones covalentes de las construcciones de anticuerpo también se incluyen dentro del alcance de esta invención y, generalmente, pero no siempre, se realizan postraduccionalmente. Por ejemplo, varios tipos de modificaciones covalentes de la construcción de anticuerpo se introducen en la molécula al hacer reaccionar residuos de aminoácido específicos de la construcción de anticuerpo con un agente derivador orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas de los residuos N- o C-terminales.

Los residuos cisteinilo se hacen reaccionar lo más comúnmente con α -haloacetatos (y las correspondientes aminas), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos cisteinilo también se derivan mediante la reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozoi)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil-2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos histidilo se derivan mediante la reacción con pirocarbonato de dietilo a pH 5,5-7,0 debido a que este

agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0. Los residuos lisinilo y aminoterminales se hacen reaccionar con anhídridos de ácido succínico u otro ácido carboxílico. La derivación con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos lisinilo. Otros reactivos adecuados para la derivación de residuos que contienen amino en alfa incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y la reacción con glioxilato catalizada por transaminasas.

Los residuos arginilo se modifican mediante la reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivación de residuos arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de la lisina así como el grupo amino en épsilon de la arginina.

La modificación específica de residuos tirosilo se puede realizar, con particular interés en introducir etiquetas espectrales en residuos tirosilo, mediante la reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Lo más comúnmente, se usan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetiltirosilo y derivados nitrados en 3, respectivamente. Los residuos tirosilo se yodan usando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas etiquetadas para el uso en un radioinmunoensayo, siendo adecuado el método de la cloramina T descrito anteriormente.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante la reacción con carbodiimidas ($\text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N--R}'$), donde R y R' son grupos alquilo opcionalmente diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos aspartilo y glutamilo se convierten en residuos asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones amonio.

La derivación con agentes bifuncionales es útil para reticular las construcciones de anticuerpo de la presente invención hasta una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para el uso en una variedad de métodos. Agentes de reticulación comúnmente usados incluyen, p. ej., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(propionato de succinimidilo), y maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes de derivación tales como el 3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato de metilo dan productos intermedios fotoactivables que son capaces de formar reticulaciones en presencia de luz. Alternativamente, se emplean para la inmovilización de proteínas matrices insolubles en agua tales como carbohidratos activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las Pat. EE. UU. N° 3.969.287, 3.691.016, 4.195.128, 4.247.642, 4.229.537 y 4.330.440.

Los residuos glutaminilo y asparaginilo se desamidán frecuentemente hasta los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente. Alternativamente, estos residuos se desamidán bajo condiciones suavemente ácidas. Cualquier forma de estos residuos se encuentra dentro del alcance de esta invención.

Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos amino en α de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente de las construcciones de anticuerpo incluidas dentro del alcance de esta invención comprende alterar el patrón de glucosilación de la proteína. Como se sabe en la técnica, los patrones de glucosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (p. ej., la presencia o ausencia de residuos de glucosilación de aminoácido particulares, analizado posteriormente), o la célula u organismo anfitrión en el que se produce la proteína. Sistemas de expresión particulares se analizan posteriormente.

La glucosilación de polipéptidos típicamente está bien ligada a N o bien ligada a O. Ligada a N se refiere al enlace del resto carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para el enlace enzimático del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. Glucosilación ligada a O se refiere al enlace de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación a la construcción de anticuerpo se efectúa convenientemente al alterar la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación ligada a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia de partida (para sitios de glucosilación ligada a O). Por facilidad, la secuencia de aminoácidos de una construcción de anticuerpo se altera preferiblemente a través de cambios a nivel de ADN, particularmente al mutar el ADN que codifica el polipéptido en bases preseleccionadas de modo que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio para incrementar el número de restos de carbohidrato en la construcción de anticuerpo es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos ya que no

requieren la producción de la proteína en una célula anfitriona que tenga capacidades de glucosilación para la glucosilación ligada a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el azúcar o los azúcares se pueden enlazar a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de la fenilalanina, la tirosina o el triptófano o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 y en Aplin y Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

La retirada de restos carbohidrato presentes en la construcción de anticuerpo de partida se puede efectuar químicamente o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría de todos los azúcares excepto el azúcar de ligazón (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja el polipéptido intacto. La desglucosilación química es descrita por Hakimuddin y cols., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge y cols., 1981, Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de restos de carbohidrato en polipéptidos se puede conseguir mediante el uso de una variedad de endo- y exoglucosidasas según se describe por Thotakura y cols., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. La glucosilación en sitios de glucosilación potenciales se puede evitar mediante el uso del compuesto tunicamicina según se describe por Duskin y cols., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces proteína-N-glucósido.

Otras modificaciones de la construcción de anticuerpo se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, otro tipo de modificación covalente de la construcción de anticuerpo comprende ligar la construcción de anticuerpo a diversos polímeros no proteínicos, incluyendo, pero no limitados a, diversos polioles tales como polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, del modo indicado en las Pat. EE. UU. N° 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 o 4.179.337. Además, como se sabe en la técnica, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos en diversas posiciones dentro de la construcción de anticuerpo, p. ej., a fin de facilitar la adición de polímeros tales como PEG.

En algunas realizaciones, la modificación covalente de las construcciones de anticuerpo de la invención comprende la adición de una o más etiquetas. El grupo de etiquetado se puede acoplar a la construcción de anticuerpo a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. Diversos métodos para etiquetar proteínas se conocen en la técnica y se pueden usar al ejecutar la presente invención. El término "etiqueta" o "grupo de etiquetado" se refiere a cualquier etiqueta detectable. En general, las etiquetas se encuentran dentro de una variedad de clases, dependiendo del ensayo en el que se vayan a detectar – los siguientes ejemplos incluyen, pero no se limitan a:

a) etiquetas isotópicas, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados, tales como radioisótopos o radionúclidos (p. ej., ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I)

b) etiquetas magnéticas (p. ej., partículas magnéticas)

c) restos activos redox

d) un colorante óptico (incluyendo, pero no limitado a, cromóforos, fósforos y fluoróforos) tales como grupos as fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), grupos quimioluminiscentes y fluoróforos que pueden ser bien fluoros "micromoleculares" o bien fluoros proteínicos

e) grupos enzimáticos (p. ej. peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina)

f) grupos biotinilados

g) epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (p. ej., secuencias del par de cremalleras de leucinas, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, identificadores epitópicos, etc.)

Por "etiqueta fluorescente" se entiende cualquier molécula que se pueda detectar a través de sus propiedades fluorescentes inherentes. Etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde malaquita, estilbeno, amarillo de Lucifer, Cascade BlueJ, rojo Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, verde Oregón, los tintes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, rodamina y rojo Texas (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Tintes ópticos adecuados, incluyendo fluoróforos, se describen en Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland.

Etiquetas fluorescentes proteínicas adecuadas también incluyen, pero no se limitan a, proteína fluorescente verde, incluyendo una especie de Renilla, Ptilosarcus o Aequorea de GFP (Chalfie y cols., 1994, Science 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Número de Registro del Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canadá H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim y cols., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), proteína fluorescente amarilla

potenciada (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferasa (Ichiki y cols., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β galactosidasa (Nolan y cols., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) y Renilla (documentos WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, Patentes de EE. UU. N° 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558).

Los dominios de cremalleras de leucinas son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucinas se identificaron originalmente en varias proteínas que se unen a ADN (Landschulz y cols., 1988, Science 240:1759), y se han encontrado desde entonces en una variedad de proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucinas conocidas están péptidos presentes en la naturaleza y sus derivados que se dimerizan o trimerizan. Ejemplos de dominios de cremallera de leucinas adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucinas derivada de proteína tensioactiva pulmonar D (SPD) descrita en Hoppe y cols., 1994, FEBS Letters 344:191. El uso de una cremallera de leucinas modificada que permita una trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada a la misma se describe en Fanslow y cols., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. En un enfoque, proteínas de fusión recombinantes que comprenden un fragmento o derivado de anticuerpo para CDH19 fusionado a un péptido de cremallera de leucinas se expresan en células anfitrionas adecuadas, y los fragmentos o derivados de anticuerpo para CDH19 oligómeros que se forman se recuperan del sobrenadante de cultivo.

La construcción de anticuerpo de la invención también puede comprender dominios adicionales, que, p. ej., son prácticos en el aislamiento de la molécula o se refieren a un perfil farmacocinético adaptado de la molécula. Dominios prácticos para el aislamiento de una construcción de anticuerpo se pueden seleccionar de motivos peptídicos o restos introducidos secundariamente, que se pueden capturar en un método de aislamiento, p. ej. una columna de aislamiento. Realizaciones no limitativas de estos dominios adicionales comprenden motivos peptídicos conocidos como identificador de Myc, identificador de HAT, identificador de HA, identificador de TAP, identificador de GST, dominio de unión a quitina (identificador de CBD), proteína de unión a maltosa (identificador de MBP), identificador de Flag, identificador de Strep y sus variantes (p. ej. identificador de StreptII) e identificador de His. Se prefiere que todas las construcciones de anticuerpo divulgadas en el presente documento caracterizadas por las CDRs identificadas to comprendan un dominio identificador de His, que se conoce generalmente como una repetición de residuos de His consecutivos en la secuencia de aminoácidos de una molécula, preferiblemente de seis residuos de His.

El primer dominio de unión de la construcción de anticuerpo de la presente invención se une a CDH19 humano sobre la superficie de una célula diana. La secuencia de aminoácidos de CDH19 humano se representa mediante SEQ ID NO: 1834. Se entiende que el término "sobre la superficie" significa en el contexto de la presente invención que el dominio de unión se une específicamente a un epítipo o agrupación de epítipos comprendidos dentro del dominio extracelular de CDH19 (CDH19 ECD). De ahí que el primer dominio de unión según la invención se una preferiblemente a CDH19 cuando sea expresado por células o líneas celulares de expresión natural, y/o por células o líneas celulares transformadas o transfectadas (establemente / transitoriamente) con CDH19. En una realización preferida, el primer dominio de unión también se une a CDH19 cuando CDH19 se usa como molécula "diana" o "ligando" en un ensayo de unión *in vitro* tal como BIAcore o Scatchard. La "célula diana" puede ser cualquier célula procariontíca o eucariótica que exprese CDH19 sobre su superficie; preferiblemente la célula diana es una célula que es parte del organismo de un ser humano o un animal, tal como una célula de melanoma.

El término "CDH19 ECD" se refiere a una forma de CDH19 que está esencialmente libre de dominios transmembranarios y citoplásmicos de CDH19. El experto entenderá que el dominio transmembranario identificado para el polipéptido CDH19 de la presente invención se identifica conforme a criterios empleados normalmente en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembranario pueden variar pero lo más probablemente en no más de alrededor de 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio mencionado específicamente en el presente documento. Un CDH19 ECD humano preferido se muestra en SEQ ID NO: 1836.

La afinidad del primer dominio de unión para CDH19 humano es preferiblemente ≤ 15 nM, más preferiblemente ≤ 10 nM, aún más preferiblemente ≤ 5 nM, aún más preferiblemente ≤ 1 nM, aún más preferiblemente $\leq 0,5$ nM, aún más preferiblemente $\leq 0,1$ nM y lo más preferiblemente $\leq 0,05$ nM. La afinidad se puede medir, por ejemplo, en un ensayo de BIAcore o en un ensayo de Scatchard, p. ej. según se describe en los Ejemplos. Otros métodos para determinar la afinidad son bien conocidos por los expertos.

Las células T o linfocitos T son un tipo de linfocito (en sí mismo un tipo de glóbulo blanco) que representa un papel fundamental en la inmunidad mediada celularmente. Existen varios subgrupos de células T, cada una con una función distinta. Las células T se pueden distinguir de otros linfocitos, tales como células B y células NK, por la presencia de un receptor de células T (TCR) sobre la superficie celular. El TCR es responsable de reconocer antígenos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y está compuesto de dos cadenas proteínicas diferentes. En el 95% de las células T, el TCR consiste en una cadena alfa (α) y una beta (β). Cuando el TCR se acopla con el péptido antigénico y el MHC (complejo péptido / MHC), el linfocito T se activa a través de una serie de episodios bioquímicos mediados por enzimas asociadas, correceptores, moléculas adaptadoras especializadas y factores de transcripción activados o liberados.

El complejo receptor CD3 es un complejo proteínico y está compuesto por cuatro cadenas. En los mamíferos, el

complejo contiene una cadena CD3 γ (gamma), una cadena CD3 δ (delta) y dos cadenas CD3 ϵ (épsilon). Estas cadenas se asocian con el receptor de células T (TCR) y la llamada cadena ζ (zeta) para formar el complejo CD3 receptor de células T y para generar una señal de activación en linfocitos T. Las cadenas CD3 γ (gamma), CD3 δ (delta) y CD3 ϵ (épsilon) son proteínas de la superficie celular muy relacionadas de la superfamilia de inmunoglobulinas que contiene un solo dominio inmunoglobulínico extracelular. Las colas intracelulares de las moléculas de CD3 contienen un solo motivo conservado conocido como un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor o ITAM por brevedad, que es esencial para la capacidad de señalización del TCR. La molécula de CD3 épsilon es un polipéptido que en los seres humanos es codificado por el gen *CD3E* que reside en el cromosoma 11. La secuencia de un dominio extracelular CD3 épsilon humano preferido se muestra en SEQ ID NO: 1844, y el epítipo de unión a CD3 más preferido correspondiente a los residuos de aminoácido 1-27 del dominio extracelular CD3 épsilon humano se representa en SEQ ID NO: 1845.

La lisis redirigida de células diana a través de la incorporación de células T por una construcción de anticuerpo multiespecífica, al menos biespecífica, implica la formación de sinapsis citolíticas y el aporte de perforina y granzimas. Las células T acopladas son capaces de lisis de células diana en serie, y no se ven afectadas por mecanismos de escape inmunitario que interfieren con el procesamiento y la presentación de antígenos peptídicos, o la diferenciación clonal de células T; véase, por ejemplo, el documento WO 2007/042261.

La citotoxicidad mediada por construcciones de anticuerpo biespecíficas CDH19/CD3 se puede medir de diversos modos. Las células efectoras pueden ser, p. ej., células T positivas a CD8 (humanas) enriquecidas estimuladas o células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) (humanas) no estimuladas. Si las células diana son de origen de macaco o expresan o están transfectadas con CDH19 de macaco, las células efectoras también deben ser de origen de macaco tales como una línea de células T de macaco, p. ej. 4119LnPx. Las células diana deben expresar (al menos el dominio extracelular de) CDH19, p. ej., CDH19 humano o de macaco. Las células diana pueden ser una línea celular (tal como CHO) que esté transfectada establemente o transitoriamente con CDH19, p. ej. CDH19 humano o de macaco. Alternativamente, las células diana pueden ser una línea celular expresadora natural positiva a CDH19, tal como la línea celular de mieloma humano CHL-1 o Colo-699. Habitualmente, se espera que los valores de EC₅₀ sean inferiores con líneas de células diana que expresen niveles superiores de CDH19 sobre la superficie celular. La relación de célula efectora a diana (E:T) está habitualmente alrededor de 10:1, pero también puede variar. La actividad citotóxica de construcciones de anticuerpo biespecíficas CDH19/CD3 se puede medir en un ensayo de liberación de cromo 51 (tiempo de incubación de alrededor de 18 horas) o en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS (tiempo de incubación de alrededor de 48 horas). También son posibles modificaciones del tiempo de incubación del ensayo (reacción citotóxica). Otros métodos para medir la citotoxicidad son muy conocidos para el experto y comprenden ensayos de MTT o MTS, ensayos basados en ATP incluyendo ensayos bioluminiscentes, el ensayo de sulforrodamina B (SRB), el ensayo de WST, un ensayo clonogénico y la tecnología de ECIS.

La actividad citotóxica mediada por construcciones de anticuerpo biespecíficas CDH19/CD3 de la presente invención se mide preferiblemente en un ensayo de citotoxicidad basado en células. Se representa por el valor de EC₅₀, que corresponde a la concentración eficaz semimáxima (concentración de la construcción de anticuerpo que induce una respuesta citotóxica intermedia entre el valor de referencia y el máximo). Preferiblemente, el valor de EC₅₀ de las construcciones de anticuerpo biespecíficas CDH19/CD3 es ≤ 20.000 pg/ml, más preferiblemente ≤ 5000 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 1000 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 500 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 350 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 250 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 100 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 50 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 10 pg/ml y lo más preferiblemente ≤ 5 pg/ml.

Cualquiera de los valores de EC₅₀ dados anteriores se puede combinar con uno cualquiera de los supuestos indicados de un ensayo de citotoxicidad basado en células. Por ejemplo, cuando se usan células T positivas a CD8 (humanas) o una línea de células T de macaco como células efectoras, el valor de EC₅₀ de la construcción de anticuerpo biespecífica CDH19/CD3 es preferiblemente ≤ 1000 pg/ml, más preferiblemente ≤ 500 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 250 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 100 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 50 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 10 pg/ml y lo más preferiblemente ≤ 5 pg/ml. Si en este ensayo las células diana son células transfectadas con CDH19 (humano o de macaco) tales como células CHO, el valor de EC₅₀ de la construcción de anticuerpo biespecífica CDH19/CD3 es preferiblemente ≤ 150 pg/ml, más preferiblemente ≤ 100 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 50 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 30 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 10 pg/ml y lo más preferiblemente ≤ 5 pg/ml. Si las células diana son una línea celular expresadora natural positiva a CDH19, entonces el valor de EC₅₀ es preferiblemente ≤ 350 pg/ml, más preferiblemente ≤ 250 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 200 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 100 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 150 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 100 pg/ml y lo más preferiblemente ≤ 50 pg/ml, o inferior. Cuando se usan PBMNCs (humanas) como células efectoras, el valor de EC₅₀ de la construcción de anticuerpo biespecífica CDH19/CD3 es preferiblemente ≤ 1000 pg/ml, más preferiblemente ≤ 750 pg/ml, más preferiblemente ≤ 500 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 350 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 250 pg/ml, aún más preferiblemente ≤ 100 pg/ml y lo más preferiblemente ≤ 50 pg/ml, o inferior.

Preferiblemente, las construcciones de anticuerpo biespecíficas CDH19/CD3 de la presente invención no inducen / median en la lisis o esencialmente no inducen / median en la lisis de células negativas a CDH19 tales como células CHO. El término "no inducen la lisis", "esencialmente no inducen la lisis", "no median en la lisis" o "esencialmente no median en la lisis" significa que una construcción de anticuerpo de la presente invención no induce o media en la lisis de más de 30%, preferiblemente no más de 20%, más preferiblemente no más de 10%, particularmente no más de

9%, 8%, 7%, 6% o 5% de células negativas a CDH19, con lo que se establece que la lisis de una línea celular positiva a CDH19 tal como CHL-1 o Colo-699 es de 100%. Esto se aplica habitualmente para concentraciones de la construcción de anticuerpo de hasta 500 nM. El experto sabe cómo medir la lisis celular sin más preámbulos. Por otra parte, la presente memoria descriptiva enseña instrucciones específicas de cómo medir la lisis celular.

5 La diferencia en actividad citotóxica entre la isoforma monómera y la dímera de construcciones de anticuerpo biespecíficas CDH19/CD3 individuales se denomina "hueco de potencia". Este hueco de potencia, p. ej., se puede calcular como la relación entre valores de EC_{50} de la forma monómera y dímera de la molécula. Los huecos de potencia de las construcciones de anticuerpo biespecíficas CDH19/CD3 de la presente invención son preferiblemente ≤ 5 , más preferiblemente ≤ 4 , aún más preferiblemente ≤ 3 , aún más preferiblemente ≤ 2 y lo más preferiblemente ≤ 1 .

10 El primer y/o el segundo (o cualquiera adicional) dominio o dominios de unión de la construcción de anticuerpo de la invención son preferiblemente específicos entre especies para miembros del orden de mamíferos de los primates. Dominios de unión a CD3 específicos entre especies se describen, por ejemplo, en el documento WO 2008/119567. Según una realización, el primer y/o el segundo dominio de unión, además de unirse a CDH19 humano y CD3 humano, respectivamente, también se unirá a CDH19 / CD3 de primates incluyendo (pero no limitados a) primates del nuevo mundo (tales como *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* o *Saimiri sciureus*), primates del viejo mundo (tales como babuinos y macacos), gibones y homínidos no humanos.

En un aspecto de la invención, el primer dominio de unión se une a CDH19 humano y además se une a CDH19 de macaco, tal como CDH19 de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 1835). La afinidad del primer dominio de unión para CDH19 de macaco es preferiblemente ≤ 15 nM, más preferiblemente ≤ 10 nM, aún más preferiblemente ≤ 5 nM, aún más preferiblemente ≤ 1 nM, aún más preferiblemente $\leq 0,5$ nM, aún más preferiblemente $\leq 0,1$ nM y lo más preferiblemente $\leq 0,05$ nM o incluso $\leq 0,01$ nM.

Preferiblemente, el hueco de afinidad de las construcciones de anticuerpo según la invención para unirse a CDH19 de macaco frente a CDH19 humano [maCDH19:huCDH19] está entre 0,1 y 10, más preferiblemente entre 0,2 y 5, aún más preferiblemente entre 0,3 y 2,5, aún más preferiblemente entre 0,4 y 2 y lo más preferiblemente entre 0,5 y 1.

25 En una realización de la construcción de anticuerpo de la invención, el segundo dominio de unión se une a CD3 épsilon de humano y de *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* o *Saimiri sciureus*. *Callithrix jacchus* y *Saguinus oedipus* son ambos primates del nuevo mundo pertenecientes a la familia de *Callitrichidae*, mientras que *Saimiri sciureus* es un primate del nuevo mundo perteneciente a la familia de *Cebidae*.

La construcción de anticuerpo de la presente invención se caracteriza por el segundo dominio de unión que se une a CD3 humano sobre la superficie de una célula T que comprende una región VL según se representa en SEQ ID NO: 179 del documento WO 2008/119567 y una región VH según se representa en SEQ ID NO: 177 del documento WO 2008/119567.

En la construcción de anticuerpo de la presente invención, los dominios de unión y en particular el segundo dominio de unión (que se une a CD3 humano sobre la superficie de una célula T) tienen el siguiente formato: Los pares de regiones VH y regiones VL están en el formato de un anticuerpo monocatenario (scFv). Las regiones VH y VL se disponen en el orden VH-VL o VL-VH. Se prefiere que la región VH esté situada N-terminalmente con respecto a una secuencia ligadora y la región VL esté situada C-terminalmente de la secuencia ligadora.

Una realización preferida de la construcción de anticuerpo descrita anteriormente de la presente invención se caracteriza por el segundo dominio de unión que se une a CD3 humano sobre la superficie de una célula T que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 185 del documento WO 2008/119567.

En una realización de la presente invención, la construcción de anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias que se representan en SEQ ID NOs: 13, 26, 39, 78, 91, 104, 117, 130, 143, 169, 182, 195, 234, 286, 299, 312, 325, 338, 351, 390, 403, 429, 442, 481, 507, 520, 533, 546, 559, 585, 611, 612, 613, 614, 617-622, 624-626, 629, 633-636, 637, 638, 641, 642, 644, 645, 648, 650, 651-654, 656, 658, 659, 660, 661, 664-669, 671-673, 676, 680-683, 684, 685, 688, 689, 691, 692, 695, 697, 698-701, 703, 705, 706, 707, 708, 711-716, 718-720, 723, 727-730, 731, 732, 735, 736, 738, 739, 742, 744, 745-748, 750, 752, 753, 754, 755, 758-763, 765-767, 770, 774-777, 778, 779, 782, 783, 785, 786, 789, 791, 792-795, 797, 799, 800, 801, 802, 805-810, 812-814, 817, 821-824, 825, 826, 829, 830, 832, 833, 836, 838, 839-842, 844, 846, 847, 848, 849, 852-857, 859-861, 864, 868-871, 872, 873, 876, 877, 879, 880, 883, 885, 886-889, 891, 893, 894, 895, 896, 899-904, 906-908, 911, 915-918, 919, 920, 923, 924, 926, 927, 930, 932, 933-936, 938, 940, 941, 942, 943, 946-951, 953-955, 958, 962-965, 966, 967, 970, 971, 973, 974, 977, 979, 980-983, 985, 987, 988, 989, 990, 993-998, 1000-1002, 1005, 1009-1012, 1013, 1014, 1017, 1018, 1020, 1021, 1024, 1026, 1027-1030, 1032, 1034, 1035, 1036, 1037, 1040-1045, 1047-1049, 1052, 1056-1059, 1060, 1061, 1064, 1065, 1067, 1068, 1071, 1073, 1074-1077, 1079, 1081, 1082, 1083, 1084, 1087-1092, 1094-1096, 1099, 1103-1106, 1107, 1108, 1111, 1112, 1114, 1115, 1118, 1120, 1121-1124, 1126, 1128, 1129, 1130, 1131, 1134-1139, 1141-1143, 1146, 1150-1153, 1154, 1155, 1158, 1159, 1161, 1162, 1165, 1167, 1168-1171, 1173, 1175, 1176, 1177, 1178, 1181-1186, 1188-1190, 1193, 1197-1200, 1201, 1202, 1205, 1206, 1208, 1209, 1212, 1214, 1215-1218, 1220, 1222, 1223, 1224, 1225, 1228-1233, 1235-1237, 1240, 1244-1247, 1248, 1249, 1252, 1253, 1255, 1256, 1259, 1261, 1262-1265, 1267, 1269, 1270, 1271, 1272, 1275-1280, 1282-1284, 1287, 1291-1294, 1295, 1296, 1299,

1300, 1302, 1303, 1306, 1308, 1309-1312, 1314, 1316, 1317, 1318, 1319, 1322-1327, 1329-1331, 1334, 1338-1341, 1342, 1343, 1346, 1347, 1349, 1350, 1353, 1355, 1356-1359, 1361, 1363, 1364, 1365, 1366, 1369-1374, 1376-1378, 1381, 1385-1388, 1389, 1390, 1393, 1394, 1396, 1397, 1400, 1402, 1403-1406, 1408, 1410, 1411, 1412, 1413, 1416-1421, 1423-1425, 1428, 1432-1435, 1436, 1437, 1440, 1441, 1443, 1444, 1447, 1449, 1450-1453, 1455, 1457, 1458, 1459, 1460, 1463-1468, 1470-1472, 1475, 1479-1482, 1483, 1484, 1487, 1488, 1490, 1491, 1494, 1496, 1497-1500, 1502, 1504, 1505, 1506, 1507, 1510-1515, 1517-1519, 1522, 1526-1529, 1530, 1531, 1534, 1535, 1537, 1538, 1541, 1543, 1544-1547, 1549, 1551, 1552, 1553, 1554, 1557-1562, 1564-1566, 1569, 1573-1576, 1577, 1578, 1581, 1582, 1584, 1585, 1588, 1590, 1591-1594, 1596, 1598, 1599, 1600, 1601, 1604-1609, 1611-1613, 1616, 1620-1623, 1624, 1625, 1628, 1629, 1631, 1632, 1635, 1637, 1638-1641, 1643, 1645, 1646, 1647, 1648, 1651-1656, 1658-1660, 1663, 1667-1670, 1671, 1672, 1675, 1676, 1678, 1679, 1682, 1684, 1685-1688, 1690, 1692, 1693, 1694, 1695, 1698-1703, 1705-1707, 1710, 1714-1717, 1718, 1719, 1722, 1723, 1725, 1726, 1729, 1731, 1732-1735, 1737, 1739, 1740, 1741, 1742, 1745-1750, 1752-1754, 1757, 1761-1764, 1765, 1766, 1769, 1770, 1772, 1773, 1776, 1778, 1779-1782, 1784, 1786, 1787, 1788, 1789, 1792-1797, 1799-1801, 1804, 1808-1811, 1812, 1813, 1816, 1817, 1819, 1820, 1823, 1825, 1826-1829, 1831 y 1833.

También se contemplan modificaciones de las secuencias de aminoácidos de las construcciones de anticuerpo descritas en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas de la construcción de anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de las construcciones de anticuerpo preparan al introducir cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico de las construcciones de anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Todas las modificaciones de secuencias de aminoácidos descritas posteriormente dan como resultado una construcción de anticuerpo que todavía retiene la actividad biológica deseada (unión a CDH19 y a CD3) de la molécula original no modificada.

El término "aminoácido" o "residuo de aminoácido" se refiere típicamente a un aminoácido que tiene su definición reconocida en la técnica tal como un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: alanina (Ala o A); arginina (Arg o R); asparagina (Asn o N); ácido aspártico (Asp o D); cisteína (Cys o C); glutamina (Gln o Q); ácido glutámico (Glu o E); glicina (Gly o G); histidina (His o H); isoleucina (He o I); leucina (Leu o L); lisina (Lys o K); metionina (Met o M); fenilalanina (Phe o F); prolina (Pro o P); serina (Ser o S); treonina (Thr o T); triptófano (Trp o W); tirosina (Tyr o Y); y valina (Val o V), aunque se pueden usar aminoácidos modificados, sintéticos o raros según se desee. Generalmente, los aminoácidos se pueden agrupar según tengan una cadena lateral apolar (p. ej., Ala, Cys, He, Leu, Met, Phe, Pro, Val); una cadena lateral cargada negativamente (p. ej., Asp, Glu); una cadena lateral cargada positivamente (p. ej., Arg, His, Lys); o una cadena lateral polar no cargada (p. ej., Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp y Tyr).

Modificaciones de aminoácidos incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de las construcciones de anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procedimientos postraduccionales de las construcciones de anticuerpo, tales como un cambio en el número o la posición de sitios de glucosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones de las construcciones de anticuerpo que son posiciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por escaneo de alaninas" según se describe por Cunningham y Wells en *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, un residuo o grupo de residuos diana dentro de la construcción de anticuerpo se identifica (p. ej. residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el epítipo.

Las posiciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación al introducir variantes adicionales u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Así, aunque el sitio o la región para la introducción de una variación de la secuencia de aminoácidos esté predeterminado, la naturaleza de la mutación de por sí no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar u optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se puede efectuar mutagénesis por escaneo de alaninas o aleatoria en un codón u región diana, y las variantes de construcción de anticuerpo expresadas se criban con respecto a la combinación óptima de actividad deseada. Son bien conocidas técnicas para realizar mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tiene una secuencia conocida, por ejemplo, mutagénesis del cebador M13 y mutagénesis por PCR. El cribado de los mutantes se realiza usando ensayos de actividades de unión a antígenos, tales como unión a CDH19.

Las sustituciones (o reemplazos) preferidas son las sustituciones conservativas. Sin embargo, se prevé cualquier sustitución (incluyendo una sustitución no conservativa o una o más de las "sustituciones ejemplares" listadas en la Tabla 1, posteriormente) siempre que la construcción de anticuerpo retenga su capacidad para unirse a CDH19 a través del primer dominio de unión y a CD3 épsilon a través del segundo dominio de unión.

Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si estas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla A, o como se describe adicionalmente más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, y los productos se pueden cribar con respecto a una característica deseada.

Tabla A: Sustituciones de aminoácidos

Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
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	leu
Leu (L)	norleucina, ile, val, met, ala	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala	leu

Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de la construcción de anticuerpo de la presente invención se consiguen al seleccionar sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación laminar o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos presentes en la naturaleza se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de las cadenas laterales: (1) hidrófobas: norleucina, met, ala, val, leu, ile; (2) hidrófilas neutras: cys, ser, thr; (3) ácidas: asp, glu; (4) básicas: asn, gin, his, lys, arg; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y (6) aromáticas: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada de la construcción de anticuerpo se puede sustituir, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar reticulación aberrante. A la inversa, se pueden añadir un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Para secuencias de aminoácidos, la identidad y/o la similitud de secuencias se determina al usar técnicas estándar

conocidas en la técnica, incluyendo, pero no limitadas a, el algoritmo de identidad de secuencias local de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, el algoritmo de alineamiento de identidad de secuencias de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, ejecuciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), el programa de secuencias Best Fit descrito por Devereux y cols., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, preferiblemente usando las graduaciones prefijadas, o mediante inspección. Preferiblemente, el porcentaje de identidad se calcula mediante FastDB basándose en los siguientes parámetros: penalización por discrepancia de 1; penalización por hueco de 1; penalización por tamaño del hueco de 0,33; y penalización por conexión de 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento de múltiples secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos por pares. También puede representar un árbol que muestra las relaciones de agrupamiento usadas para crear el alineamiento. PILEUP usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; el método es similar al descrito por Higgins y Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Parámetros de PILEUP incluyen un peso del hueco prefijado de 3,00, un peso de la longitud del hueco prefijado de 0,10, y huecos extremos ponderados.

Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en: Altschul y cols., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul y cols., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; y Karin y cols., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787. Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 que se obtuvo de Altschul y cols., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se gradúa a los valores prefijados. Los parámetros ajustables se gradúan con los siguientes valores: amplitud de solapamiento =1, fracción de solapamiento =0,125, umbral de palabra (T)=11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y son establecidos por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia y composición particulares de la base de datos particular frente a la que se está buscando la secuencia de interés; sin embargo, los valores de pueden ajustar para incrementar la sensibilidad.

Un algoritmo útil adicional es BLAST con huecos según se presente por Altschul y cols., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. BLAST con huecos usa puntuaciones de sustitución BLOSUM-62; parámetro T liminar graduado a 9; el método de dos aciertos para activar extensiones sin huecos, carga a las longitudes de hueco de k un coste de 10+k; Xu graduado a 16, y Xg graduado a 40 para la fase de búsqueda en la base de datos y a 67 para la fase de salida de los algoritmos. Los alineamientos con huecos se activan mediante una puntuación correspondiente a alrededor de 22 bits.

En una realización, las construcciones de anticuerpo biespecíficas de la presente invención exhiben altos rendimientos de monómero bajo condiciones a escala de investigación estándar, p. ej., en un procedimiento de purificación en dos etapas estándar. Preferiblemente, el rendimiento de monómero de las construcciones de anticuerpo según la invención es ≥ 0.25 mg/l de sobrenadante, más preferiblemente ≥ 0.5 mg/l, aún más preferiblemente ≥ 1 mg/l y lo más preferiblemente ≥ 3 mg/l de sobrenadante.

Asimismo, se puede determinar el rendimiento de las isoformas dímeras de construcción de anticuerpo y de ahí el porcentaje de monómero (es decir, monómero: (monómero+dímero)) de las construcciones de anticuerpo. La productividad de construcciones de anticuerpo monómeras y dímeras y el porcentaje de monómero calculado se pueden obtener, p. ej., en la etapa de purificación por SEC del sobrenadante de cultivo procedente de la producción a escala de investigación estandarizada en frascos giratorios. En una realización, el porcentaje de monómero de las construcciones de anticuerpo es $\geq 80\%$, más preferiblemente $\geq 85\%$, aún más preferiblemente $\geq 90\%$ y lo más preferiblemente $\geq 95\%$.

En una realización adicional, el porcentaje de identidad con la línea germinal humana de las construcciones de anticuerpo según la invención es $\geq 70\%$ o $\geq 75\%$, más preferiblemente $\geq 80\%$ o $\geq 85\%$, aún más preferiblemente $\geq 90\%$ y lo más preferiblemente $\geq 95\%$. Se cree que la identidad con productos génicos de la línea germinal de anticuerpo humano es una particularidad importante para reducir el riesgo de que las proteínas terapéuticas provoquen una respuesta inmunitaria contra el fármaco en el paciente durante el tratamiento. Hwang & Foote ("Immunogenicity of engineered antibodies"; Methods 36 (2005) 3-10) demuestran que la reducción de porciones no humanas de construcciones de anticuerpo farmacológicas conduce a una disminución del riesgo de inducir anticuerpos contra el fármaco en los pacientes durante el tratamiento. Al comparar un número exhaustivo de fármacos de anticuerpo evaluados clínicamente y los respectivos datos de inmunogenicidad, se muestra la tendencia de que la humanización de las regiones V de anticuerpos hace a la proteína menos inmunogénica (promedio 5,1% de los pacientes) que anticuerpos que tienen regiones V no humanas inalteradas (promedio 23,59% de los pacientes). De ahí, que sea deseable un grado superior de identidad con secuencias humanas para una terapéutica proteínica basada en la región V en forma de construcciones de anticuerpo. Con el propósito de determinar la identidad de la línea germinal, las regiones V de VL se pueden alinear con las secuencias de aminoácidos de segmentos V y segmentos J de la línea germinal humana (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) usando el *software* Vector NTI y la secuencia de aminoácidos se puede calcular al dividir los residuos de aminoácido idénticos por el número total de residuos de aminoácido de la VL en porcentaje. Lo mismo puede ser para los segmentos de VH (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) con la excepción de

que la CDR3 de VH se puede excluir debido a su alta diversidad y una falta de socios de alineación de CDR3 de VH de la línea germinal humana existentes. A continuación, se pueden usar técnicas recombinantes para incrementar la identidad de secuencias con genes de la línea germinal del anticuerpo humano.

En una realización, las construcciones de anticuerpo tienen una estabilidad en plasma (relación de EC50 con plasma a EC50 sin plasma) preferida de ≤ 5 , más preferiblemente ≤ 4 , aún más preferiblemente ≤ 3 y lo más preferiblemente ≤ 2 . La estabilidad en plasma de una construcción de anticuerpo se puede probar mediante la incubación de la construcción en plasma humano a 37°C durante 24 horas seguida de determinación de EC50 en un ensayo de citotoxicidad con liberación de cromo 51. Las células efectoras en el ensayo de citotoxicidad pueden ser células T positivas a CD8 humanas enriquecidas estimuladas. Las células diana pueden ser, p. ej., células CHO transfectadas con CDH19 humano. La relación de células efectoras a diana (E:T) se puede elegir como 10:1. La mezcla de plasmas humanos usada con este fin se deriva de la sangre de donantes sanos recogida mediante jeringas revestidas con EDTA. Los componentes celulares se retiran mediante centrifugación y la fase plasmática superior se recoge y posteriormente se mezcla. Como control, construcciones de anticuerpo se diluyen inmediatamente antes del ensayo de citotoxicidad en medio RPMI-1640. La estabilidad en plasma se calcula como la relación de EC50 (después de la incubación en plasma) a EC50 (control).

Se prefiere que la conversión de monómero en dímero de las construcciones de anticuerpo de la invención sea baja. La conversión se puede medir bajo diferentes condiciones y analizar mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento. Por ejemplo, la incubación de las isoformas monómeras de las construcciones de anticuerpo se puede llevar a cabo durante 7 días a 37°C y concentraciones, p. ej., de 100 µg/ml o 250 µg/ml en una incubadora. Bajo estas condiciones, se prefiere que las construcciones de anticuerpo de la invención muestren un porcentaje de dímero que sea $\leq 5\%$, más preferiblemente $\leq 4\%$, aún más preferiblemente $\leq 3\%$, aún más preferiblemente $\leq 2,5\%$, aún más preferiblemente $\leq 2\%$, aún más preferiblemente $\leq 1,5\%$ y lo más preferiblemente $\leq 1\%$.

También se prefiere que las construcciones de anticuerpo biespecíficas de la presente invención se presenten con una conversión de dímero muy baja después de un número de ciclos de congelación/descongelación. Por ejemplo, el monómero de construcción de anticuerpo se ajusta hasta una concentración de 250 µg/ml, p. ej., en tampón de desarrollo de SEC y se somete a tres ciclos de congelación/descongelación (congelación a -80°C durante 30 min seguida de descongelación durante 30 min a temperatura ambiente), seguidos de SEC de alta resolución para determinar el porcentaje de construcción de anticuerpo inicialmente monómera, que se ha convertido en construcción de anticuerpo dímera. Preferiblemente, los porcentajes de dímero de las construcciones de anticuerpo biespecíficas son $\leq 5\%$, más preferiblemente $\leq 4\%$, aún más preferiblemente $\leq 3\%$, aún más preferiblemente $\leq 2,5\%$, aún más preferiblemente $\leq 2\%$, aún más preferiblemente $\leq 1,5\%$ y lo más preferiblemente $\leq 1\%$, por ejemplo después de tres ciclos de congelación/descongelación.

Las construcciones de anticuerpo biespecíficas de la presente invención muestran preferiblemente una termoestabilidad favorable con temperaturas de fusión por encima de 60°C. Este parámetro se puede determinar como sigue: Se determinan curvas de temperatura de fusión mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar las estabilidades proteínicas biofísicas intrínsecas de las construcciones de anticuerpo. Estos experimentos se realizan usando un dispositivo de VP-DSC MicroCal LLC (Northampton, MA, EE. UU. de A.). La captación de energía de una muestra que contiene una construcción de anticuerpo se registra de 20°C a 90°C en comparación con una muestra que contiene solo el tampón de formulación. Las construcciones de anticuerpo se ajustan a una concentración final de 250 µg/ml, p. ej. en tampón de desarrollo de SEC. Para el registro de la curva de fusión respectiva, la temperatura de la muestra total se incrementa por etapas. A cada temperatura T, se registra la captación de energía de la muestra y la referencia de tampón de formulación. La diferencia en la captación de energía Cp (kcal/mol/°C) de la muestra menos la referencia se representa frente a la temperatura respectiva. La temperatura de fusión se define como la temperatura en el primer máximo de captación de energía.

En una realización adicional, la construcción de anticuerpo según la invención es estable a pH ácido. Cuanto más tolerante es el comportamiento de la construcción de anticuerpo a pH no fisiológico tal como pH 5,5 (un pH que se requiere para desarrollar, p. ej., una cromatografía de intercambio catiónico), mayor es la recuperación de la construcción de anticuerpo eluida de una columna de intercambio iónico con relación a la cantidad total de proteína cargada. La recuperación de la construcción de anticuerpo de una columna de intercambio iónico (p. ej., catiónico) a pH 5,5 es preferiblemente $\geq 30\%$, más preferiblemente $\geq 40\%$, más preferiblemente $\geq 50\%$, aún más preferiblemente $\geq 60\%$, aún más preferiblemente $\geq 70\%$, aún más preferiblemente $\geq 80\%$ y lo más preferiblemente $\geq 90\%$.

Se prevé además que las construcciones de anticuerpo biespecíficas de la presente invención exhiban eficacia terapéutica o actividad antitumoral. Esto se puede valorar, p. ej., en un estudio como el divulgado en el siguiente ejemplo de un modelo de xenoinjerto tumoral humano en estadio avanzado:

El día 1 del estudio, 5×10^6 células de una línea celular cancerosa positiva a CDH19 humana se inyectan subcutáneamente en el costado posterior de ratones NOD/SCID hembra. Cuando el volumen medio del tumor alcanza alrededor de 100 mm³, células T positivas a CD3 humanas expandidas *in vitro* se trasplantan a los ratones mediante la inyección de alrededor de 2×10^7 células en la cavidad peritoneal de los animales. Los ratones del grupo 1 de control con vehículo no reciben células efectoras y se usan como un control no trasplantado para la comparación con el grupo 2 de control con vehículo (que recibe células efectoras) para verificar el impacto de células T solas sobre el crecimiento

tumoral. El tratamiento con anticuerpo comienza cuando el volumen medio del tumor alcanza alrededor de 200 mm³. El tamaño medio del tumor de cada grupo de tratamiento el día del inicio del tratamiento no debe ser estadísticamente diferente de cualquier otro grupo (análisis de varianza). Los ratones se tratan con 0,5 mg/kg/día de una construcción de anticuerpo biespecífica CDH19/CD3 mediante inyección intravenosa en embolada durante alrededor de 15 a 20 días. Los tumores se miden mediante un calibre durante el estudio y el progreso se evalúa mediante comparación entre grupos de los volúmenes de los tumores (TV). La inhibición del crecimiento tumoral T/C [%] se determina al calcular TV como $T/C\% = 100 \times (TV \text{ mediano del grupo analizado}) / (TV \text{ mediano del grupo de control } 2)$.

El experto sabe cómo modificar o adaptar ciertos parámetros de este estudio, tales como el número de células tumorales inyectadas, la zona de inyección, el número de células T humanas trasplantadas, la cantidad de construcciones de anticuerpo biespecíficas que se van a administrar y los desarrollos cronológicos, sin dejar de llegar a un resultado significativo y reproducible. Preferiblemente, la inhibición del crecimiento tumoral T/C [%] es ≤ 70 o ≤ 60 , más preferiblemente ≤ 50 o ≤ 40 , aún más preferiblemente ≤ 30 o ≤ 20 y lo más preferiblemente ≤ 10 o ≤ 5 o incluso $\leq 2,5$.

La invención proporciona además un polinucleótido / una molécula de ácido nucleico que codifica una construcción de anticuerpo de la invención.

Un polinucleótido es un biopolímero compuesto por 13 o más monómeros nucleotídicos unidos covalentemente en una cadena. El ADN (tal como ADNc) y el ARN (tal como ARNm) son ejemplos de polinucleótidos con distinta función biológica. Los nucleótidos son moléculas orgánicas que sirven como los monómeros o subunidades de moléculas de ácido nucleico como ADN o ARN. La molécula de ácido nucleico o el polinucleótido pueden ser bicatenarios y monocatenarios, lineales y circulares. Esta comprendido preferiblemente en un vector que preferiblemente está comprendido en una célula anfitriona. Dicha célula anfitriona es capaz, p. ej. después de la transformación o transfección con el vector o el polinucleótido de la invención, de expresar la construcción de anticuerpo. Con ese fin, el polinucleótido o la molécula de ácido nucleico está ligado operativamente con secuencias de control.

El código genético es el conjunto de normas por el que la información codificada dentro del material genético (ácidos nucleicos) se traduce en proteínas. La descodificación biológica en células vivas es efectuada por el ribosoma que liga aminoácidos en un orden especificado por el ARNm, usando moléculas de ARNt para trasladar aminoácidos y para leer los tres nucleótidos del ARNm a la vez. El código define cómo las secuencias de estos tripletes de nucleótidos, llamados codones, especifican qué aminoácido se añadirá a continuación durante la síntesis de la proteína. Con algunas excepciones, un codón de tres nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico especifica un aminoácido. Debido a que la inmensa mayoría de los genes son codificados exactamente con el mismo código, este código particular a menudo se denomina el código genético canónico o estándar. Aunque el código genético determina la secuencia proteínica para una región codificante dada, otras regiones genómicas pueden influir en cuándo y dónde se producen estas proteínas.

Por otra parte, la invención proporciona un vector que comprende un polinucleótido / una molécula de ácido nucleico de la invención.

Un vector es una molécula de ácido nucleico usada como un vehículo para transferir material genético (extraño) a una célula. El término "vector" abarca – pero no se restringe a – plásmidos, virus, cósmidos y cromosomas artificiales. En general, los vectores manipulados comprenden un origen de replicación, un sitio de multiclonación y un marcador seleccionable. El propio vector es generalmente una secuencia de nucleótidos, comúnmente una secuencia de ADN, que comprende una inserción (transgén) y una secuencia mayor que sirve como el "esqueleto" del vector. Los vectores modernos pueden abarcar particularidades adicionales además de la inserción transgénica y un esqueleto: promotor, marcador genético, resistencia a antibióticos, gen indicador, secuencia de direccionamiento, identificador de purificación de proteína. Los vectores llamados vectores de expresión (construcciones de expresión) son específicamente para la expresión del transgén en la célula diana, y generalmente tienen secuencias de control.

El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante ligada operativamente en un organismo anfitrión particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucarióticas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

Un ácido nucleico está "ligado operativamente" cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para una presecuencia o líder secretor está ligado operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está ligado operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está ligado operativamente a una secuencia codificante si está situado de modo que facilite la traducción. Generalmente, "ligado operativamente" significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La ligazón se efectúa mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si estos sitios no existen, los adaptadores o ligadores oligonucleotídicos sintéticos se usan según la práctica convencional.

La "transfección" es el procedimiento de introducir deliberadamente moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos

(incluyendo vectores) en células diana. El término se usa principalmente para métodos no virales en células eucarióticas. La transducción se usa a menudo para describir la transferencia mediada por virus de moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos. La transfección de células animales implica típicamente abrir poros u "orificios" transitorios en la membrana celular, para permitir la captación de material. La transfección se puede llevar a cabo usando fosfato cálcico, mediante electroporación, al exprimir las células o mediante la mezclado de un lípido catiónico con el material para producir liposomas, que se fusionan con la membrana celular y depositan su carga dentro.

El término "transformación" se usa para describir la transferencia no viral de moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos (incluyendo vectores) en bacterias, y también en célula eucarióticas no animales, incluyendo células vegetales. De ahí que la transformación sea la alteración genética de una célula eucariótica bacteriana o no animal resultante de la captación directa a través de la membrana o las membranas celulares desde sus alrededores y la incorporación posterior de material genético exógeno (moléculas de ácido nucleico). La transformación se puede efectuar por medios artificiales. Para que se produzca la transformación, las células o las bacterias deben estar en estado de competencia, lo que podría ocurrir como una respuesta de tiempo limitado a condiciones ambientales tales como inanición y densidad celular.

Por otra parte, la invención proporciona una célula anfitriona transformada o transfectada con el polinucleótido / la molécula de ácido nucleico o con el vector de la invención.

Según se usa en el presente documento, los términos "célula anfitriona" o "célula receptora" están destinados a incluir cualquier célula individual o cultivo celular que puedan ser o hayan sido receptores de vectores, moléculas de ácido nucleico exógenas y polinucleótidos que codifican la construcción de anticuerpo de la presente invención; y/o receptores de la propia construcción de anticuerpo. La introducción del material respectivo en la célula se lleva a cabo por medio de transformación, transfección y similares. El término "célula anfitriona" también está destinado a incluir la descendencia o la descendencia potencial de una célula individual. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debidas a mutación bien natural, bien accidental o bien deliberada o debido a influencias ambientales, esta descendencia puede no ser, de hecho, completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico o total) a la célula original, pero no obstante se incluye dentro del ámbito del término según se usa en el presente documento. Células anfitrionas adecuadas incluyen células procarióticas o eucarióticas, y también incluyen pero no se limitan a bacterias, células de levadura, células fúngicas, células vegetales y células animales tales como células de insecto y células de mamífero, p. ej., murinas, de rata, macaco o ser humano.

La construcción del anticuerpo de la invención se puede producir en bacterias. Después de la expresión, la construcción de anticuerpo de la invención se aísla de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar a través de, p. ej., cromatografía de afinidad y/o exclusión por tamaño. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al procedimiento para purificar anticuerpo expresado, p. ej., en células CHO.

Además de procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son anfitriones de clonación o expresión adecuados para la construcción de anticuerpo de la invención. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de cerveza común, es el más comúnmente usado entre los microorganismos anfitriones eucarióticos inferiores. Sin embargo, un número de otros géneros, especies y cepas están disponibles comúnmente y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*, anfitriones de Kluyveromyces tales como *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilum* (ATCC 36906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; yarrowia (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070); Candida; *Trichoderma reesei* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; Schwanniomycetes tales como *Schwanniomycetes occidentalis*; y hongos filamentosos tales como Neurospora, Penicillium, Tolypocladium y anfitriones de Aspergillus tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Células anfitrionas adecuadas para la expresión de una construcción de anticuerpo glucosilada de la invención se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas variantes baculovirales y las correspondientes células anfitrionas de insecto permisivas a partir de anfitriones tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Está disponible públicamente una variedad de cepas virales para transfección, p. ej., la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y estos virus se pueden usar como el virus en el presente documento según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden usar como anfitriones cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, Arabidopsis y tabaco. Vectores de clonación y expresión útiles en la producción de proteínas en un cultivo de células vegetales son conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, p. ej., Hiatt y cols., Nature (1989) 342: 76-78, Owen y cols. (1992) Bio/Technology 10: 790-794, Artsaenko y cols. (1995) The Plant J 8: 745-750, y Fecker y cols. (1996) Plant Mol Biol 32: 979-986.

Sin embargo, el mayor interés se ha puesto en células de vertebrado, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento habitual. Ejemplos de líneas celulares anfitrionas de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); una línea renal embrionaria humana (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y cols., J.

Gen Virol. 36 : 59 (1977)); células renales de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL1587); células de carcinoma cervicouterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, 1413 8065); tumor mamario de ratón tumor (MMT 060562, ATCC CCL5 1); células TRI (Mather y cols., Annals N. Y Acad. Sci. (1982) 383: 44-68); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para la producción de una construcción de anticuerpo de la invención, comprendiendo dicho procedimiento cultivar una célula anfitriona de la invención bajo condiciones que permitan la expresión de la construcción de anticuerpo de la invención y recuperar del cultivo la construcción de anticuerpo producida.

Según se usa en el presente documento, el término "cultivar" se refiere al mantenimiento, la diferenciación, el crecimiento, la proliferación y/o la propagación *in vitro* de células bajo condiciones adecuadas en un medio. El término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción de una construcción de anticuerpo de la invención incluyendo, pero no limitada, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

Cuando se usen técnicas recombinantes, la construcción de anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, secretarse directamente al medio. Si la construcción de anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, el residuo en partículas, bien células anfitrionas o bien fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter y cols., Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, una pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a lo largo de alrededor de 30 min. El residuo celular se puede retirar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes procedentes de estos sistemas de expresión generalmente se concentran en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasas tal como PMSF en cualquiera de las etapas precedentes para evitar el crecimiento de contaminantes fortuitos.

La construcción de anticuerpo de la invención preparada a partir de las células anfitrionas se puede recuperar o purificar usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poli(ácido aspártico)), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato amónico dependiendo del anticuerpo que se vaya a recuperar. Cuando la construcción de anticuerpo de la invención comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación.

La cromatografía de afinidad es una técnica de purificación preferida. La matriz a la que se enlaza el ligando de afinidad es lo más a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos de los que se pueden conseguir con la agarosa.

Por otra parte, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una construcción de anticuerpo de la invención o una construcción de anticuerpo producida según el procedimiento de la invención.

Según se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición que es adecuada para la administración a un paciente, preferiblemente un paciente humano. La composición farmacéutica particularmente preferida de esta invención comprende una o una pluralidad de las construcciones de anticuerpo de la invención, preferiblemente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende además formulaciones adecuadas de uno o más portadores, estabilizantes, excipientes, diluyentes, solubilizantes, tensioactivos, emulsionantes, conservantes y/o adyuvantes (farmacéuticamente aceptables). Los constituyentes aceptables de la composición son preferiblemente atóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a, composiciones líquidas, congeladas y liofilizadas.

Las composiciones de la invención pueden comprender un portador farmacéuticamente aceptable. En general, según se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" significa todas y cada una de las soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles, disolventes, tampones, p. ej. soluciones salinas tamponadas con fosfato (PBS), agua, suspensiones, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, liposomas, medios de dispersión y revestimientos, que sean compatibles con la administración farmacéutica, en particular con la administración parenteral. El uso de estos medios y agentes en composiciones farmacéuticas se bien conocidos en la técnica, y las composiciones que comprenden estos portadores se pueden formular mediante métodos convencionales bien conocidos.

Ciertas realizaciones proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden la construcción de anticuerpo de la invención y además uno o más excipientes tales como los descritos ilustrativamente en esta sección y en otras partes en el presente documento. Los excipientes se pueden usar en la invención a este respecto con una amplia variedad de fines, tales como el ajuste físico, químico o de las propiedades biológicas de las formulaciones, tales como el ajuste de la viscosidad, y/o procedimientos de la invención para mejorar la eficacia y/o para estabilizar estas formulaciones y procedimientos frente a la degradación y el deterioro debidos a, a modo de ejemplo, tensiones que se producen durante la fabricación, el envío, el almacenamiento, la preparación previa al uso, la administración, y posteriormente.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación con el fin de modificar, mantener o conservar, p. ej., el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o la penetración de la composición (véase, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª Edición, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company). En estas realizaciones, materiales de formulación adecuados pueden incluir, pero no se limitan a:

- aminoácidos tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, treonina, prolina, 2-fenilalanina, incluyendo aminoácidos cargados, preferiblemente lisina, acetato de lisina, arginina, glutamato y/o histidina
- antimicrobianos tales como agentes antibacterianos y antifúngicos
- antioxidantes tales como ácido ascórbico, metionina, sulfito sódico o hidrogenosulfito sódico;
- tampones, sistemas tamponadores y agentes tamponadores que se usan para mantener la composición a pH fisiológico o un pH ligeramente inferior, típicamente dentro de un intervalo de pH de alrededor de 5 a alrededor de 8 o 9; ejemplos de tampones son borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos, succinato, fosfato, histidina y acetato; por ejemplo tampón de Tris de alrededor de pH 7,0-8,5, o tampón de acetato de alrededor de pH 4,0-5,5;
- disolventes no acuosos tales como propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo;
- portadores acuosos incluyendo agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados;
- polímeros biodegradables tales como poliésteres;
- agentes de relleno tales como manitol o glicina;
- agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA);
- agentes isotónicos y retardadores de la absorción;
- agentes complejantes tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina)
- cargas;
- monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa o dextrinas); los carbohidratos pueden ser azúcares no reductores, preferiblemente trehalosa, sacarosa, octasulfato, sorbitol o xilitol;
- proteínas, polipéptidos o portadores proteínicos (de bajo peso molecular) tales como albúmina sérica bovina, gelatina o inmunoglobulinas, preferiblemente de origen humano;
- agentes colorantes y aromatizantes;
- agentes reductores que contienen azufre, tales como glutatona, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol y tiosulfato sódico
- agentes diluyentes;
- agentes emulsionantes;
- polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona)
- contraiones formadores de sal tales como sodio;
- conservantes tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares; ejemplos son: cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenilico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno);
- complejos metálicos tales como complejos de Zn-proteína;

- disolventes y codisolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol);
- azúcares y alditos, tales como trehalosa, sacarosa, octasulfato, manitol, sorbitol o xilitol estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, mioininitosa, galactosa, lactitol, ribitol, moinisitol, galactitol, glicerol, ciclitos (p. ej., inositol), polietilenglicol; y alditos polihidroxilados;
- 5 • agentes de suspensión;
- tensioactivos o agentes humectantes tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbato 20, polisorbato, Triton, trometamina, lecitina, colesterol, Tyloxapal; los tensioactivos pueden ser detergentes, preferiblemente con un peso molecular de >1,2 KD y/o un poliéter, preferiblemente con un peso molecular de >3 KD; ejemplos no limitativos de detergentes preferidos son Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 y Tween 85; ejemplos no limitativos de poliéteres preferidos son PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 y PEG 5000;
- 10 • agentes potenciadores de la estabilidad tales como sacarosa o sorbitol;
- agentes potenciadores de la tonicidad tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro sódico o potásico, manitol sorbitol;
- 15 • vehículos de aporte parenteral incluyendo solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer o aceites fijos;
- vehículos de aporte intravenoso incluyendo reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer).

Es evidente para los expertos en la técnica que los diferentes constituyentes de la composición farmacéutica (p. ej., los enumerados anteriormente) pueden tener diferentes efectos, por ejemplo, y un aminoácido puede actuar como tampón, estabilizante y/o antioxidante; el manitol puede actuar como agente de relleno y/o agente potenciador de la tonicidad; el cloruro sódico puede actuar como vehículo de aporte y/o agente potenciador de la tonicidad; etc.

Se prevé que la composición de la invención pueda comprender, además de la construcción de anticuerpo de la invención definida en el presente documento, agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uno pretendido de la composición. Estos agentes podrán ser fármacos que actúen sobre el sistema gastrointestinal, fármacos que actúen como citostáticos, fármacos que prevengan la hiperuriquemia, fármacos que inhiban inmunorreacciones (p. ej. corticosteroides), fármacos que modulen la respuesta inflamatoria, fármacos que actúen sobre el sistema circulatorio y/o agentes tales como citocinas conocidos en la técnica. También se prevé que la construcción de anticuerpo de la presente invención se aplique en una coterapia, es decir, en combinación con otro medicamento anticanceroso.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica óptima será determinada por un experto en la técnica dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración pretendida, el formato de aporte y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, anteriormente. En ciertas realizaciones, estas composiciones pueden influir en el estado físico, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de depuración *in vivo* de la construcción de anticuerpo de la invención. En ciertas realizaciones, el vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza bien acuosa o bien no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo, posiblemente complementados con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica son vehículos ejemplares adicionales. En ciertas realizaciones, las composiciones de construcción de anticuerpo de la invención se pueden preparar para el almacenamiento al mezclar la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, anteriormente) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, en ciertas realizaciones, la construcción de anticuerpo de la invención se puede formular como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para el uso en esta invención se pueden proporcionar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógenos que comprende la construcción de anticuerpo deseada de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para la inyección parenteral es agua destilada estéril en la que la construcción de anticuerpo de la invención se formula como una solución isotónica estéril, conservada apropiadamente. En ciertas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas, bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico)), cuentas o liposomas, que pueden proporcionar una liberación controlada o sostenida del producto que se puede aportar a través de inyección retardada. En ciertas realizaciones, también se puede usar ácido hialurónico, que tiene el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. En ciertas realizaciones, se pueden usar dispositivos de aporte de fármaco implantables para introducir la construcción de anticuerpo deseada.

Composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones

que impliquen la construcción de anticuerpo de la invención en formulaciones de aporte/liberación sostenidos o controlados. Técnicas para formular una variedad de otros medios de aporte sostenido o controlado, tales como portadores liposómicos, micropartículas bioerosionables o cuentas porosas e inyecciones retardadas, también son conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US93/00829, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para el aporte de composiciones farmacéuticas. Las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliálctidos (como se divulga en la Pat. EE. UU. N° 3.773.919 y la Publicación de Solicitud de Patente Europea N° EP 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo gamma (Sidman y cols., 1983, Biopolymers 2:547-556), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer y cols., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 y Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etileno-acetato de vinilo (Langer y cols., 1981, anteriormente) o poli(ácido D(-)-3-hidroxibutírico) (Publicación de Solicitud de Patente Europea N° EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas que se pueden preparar mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., Eppstein y cols., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; las Publicaciones de Solicitud de Patente Europea N° EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

La construcción de anticuerpo también se puede atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas de aporte de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Estas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Las composiciones farmacéuticas para la administración *in vivo* se proporcionan típicamente como preparaciones estériles. La esterilización se puede efectuar mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización usando este método se puede efectuar bien antes o bien después de la liofilización y la reconstitución. Las composiciones para administración parenteral se pueden almacenar en forma liofilizada o en solución. Las composiciones parenterales generalmente se introducen en un recipiente que tiene una abertura de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial para soluciones intravenosas que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica.

Otro aspecto de la invención incluye formulaciones de construcciones de anticuerpo de la invención autotamponadoras, que se pueden usar como composiciones farmacéuticas, según se describe en la solicitud de patente internacional WO 06138181A2 (documento PCT/US2006/022599). Está disponible una variedad de exposiciones sobre materiales de estabilización y formulación de proteínas y métodos útiles a este respecto, tales como Arakawa y cols., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick y cols., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution", en: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter y Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), y Randolph y cols., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), véanse particularmente las partes relativas a excipientes y procedimientos de las mismas para formulaciones proteínicas autotamponadoras según la presente invención, especialmente en lo relativo a productos farmacéuticos y procedimiento para usos médicos veterinarios y/o humanos.

Pueden usarse sales según ciertas realizaciones de la invención para, por ejemplo, ajustar la fuerza iónica y/o la isotonicidad de una formulación y/o para mejorar la solubilidad y/o la estabilidad física de una proteína u otro ingrediente de una composición según la invención. Como se sabe bien, los iones pueden estabilizar el estado natural de las proteínas al unirse a residuos cargados sobre la superficie de la proteína y al proteger a grupos cargados y polares en la proteína y reducir la fuerza de sus interacciones electrostáticas, interacciones atractivas y repulsivas. Los iones también pueden estabilizar el estado desnaturalizado de una proteína al unirse a, en particular, los enlaces peptídicos (--CONH) desnaturalizados de la proteína. Además, la interacción iónica con grupos cargados y polares en una proteína también puede reducir interacciones electrostáticas intermoleculares y, de ese modo, evitar o reducir la agregación y la insolubilidad de la proteína.

Las especies iónicas difieren significativamente en sus efectos sobre las proteínas. Se ha desarrollado un número de clasificaciones categóricas de los iones y sus efectos sobre las proteínas, que se puede usar para formular composiciones farmacéuticas según la invención. Un ejemplo es la serie de Hofmeister, que clasifica los solutos iónicos y polares no iónicos por su efecto sobre la estabilidad conformacional de proteínas en solución. Los solutos estabilizadores se denominan "cosmotrópicos". Los solutos desestabilizadores de denominan "caotrópicos". Los cosmótrofos se usan comúnmente a altas concentraciones (p. ej., sulfato amónico >1 molar) para precipitar proteínas en solución ("desestabilización salina"). Los caótrofos se usan comúnmente para denture y/o para solubilizar proteínas ("estabilización salina"). La eficacia relativa de los iones para la "estabilización salina" y la "desestabilización salina" define su posición en la serie de Hofmeister.

Se pueden usar aminoácidos libres en las formulaciones de construcciones de anticuerpo de la invención según diversas realizaciones de la invención como agentes de relleno, estabilizadores y antioxidantes, así como otros usos estándar. Se pueden usar lisina, prolina, serina y alanina para estabilizar proteínas en una formulación. La glicina es útil en la liofilización para asegurar la corrección de la estructura y las propiedades de la torta. La arginina puede ser

útil para inhibir la agregación de proteínas, en formulaciones tanto líquidas como liofilizadas. La metionina es útil como antioxidante.

Los polioles incluyen azúcares, p. ej., manitol, sacarosa y sorbitol y alcoholes polihidroxilados tales como, a modo de ejemplo, glicerol y propilenglicol, y, con fines de exposición en el presente documento, polietilenglicol (PEG) y sustancias relacionadas. Los polioles son cosmotrópicos. Son agentes estabilizantes útiles en formulaciones tanto líquidas como liofilizadas para proteger las proteínas de procesos de degradación física y química. Los polioles también son útiles para ajustar la tonicidad de las formulaciones. Entre los polioles útiles en realizaciones seleccionadas de la invención se encuentra el manitol, comúnmente usado para asegurar la estabilidad estructural de la torta en formulaciones liofilizadas. Asegura la estabilidad estructural de la torta. Generalmente, se usa con un lioprotector, p. ej., sacarosa. El sorbitol y la sacarosa se encuentran entre los agentes preferidos para ajustar la tonicidad y como estabilizadores para proteger contra las tensiones de congelación-descongelación durante el transporte o la preparación de productos a granel durante el procedimiento de fabricación. Los azúcares reductores (que contienen grupos aldehído o cetona libres), como la glucosa y la lactosa, pueden glicar residuos superficiales de lisina y arginina. Por lo tanto, generalmente no se encuentran entre los polioles preferidos para su uso según la invención. Además, los azúcares que forman estas especies reactivas, tales como sacarosa, que se hidroliza a fructosa y glucosa bajo condiciones ácidas y, en consecuencia, engendra glicación, tampoco se encuentran entre los polioles preferidos de la invención a este respecto. El PEG es útil para estabilizar proteínas y como crioprotector y se puede usar en la invención a este respecto.

Realizaciones de las formulaciones de construcciones de anticuerpo de la invención comprenden además tensioactivos. Las moléculas proteínicas pueden ser sensibles a la adsorción sobre superficies y a la desnaturalización y la consiguiente agregación en las interfases aire-líquido, sólido-líquido y líquido-líquido. Estos efectos generalmente aumentan escalonadamente inversamente con la concentración de proteína. Estas interacciones perjudiciales generalmente aumentan escalonadamente inversamente con la concentración de proteína y típicamente se ven exacerbadas por la agitación física, tal como la generada durante el envío y la manipulación de un producto. Los tensioactivos se usan habitualmente para prevenir, minimizar o reducir la adsorción superficial. Tensioactivos útiles en la invención a este respecto incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitán, y poloxámero 188. Los tensioactivos también se usan comúnmente para controlar la estabilidad conformacional de las proteínas. El uso de tensioactivos a este respecto es específico de la proteína ya que cualquier tensioactivo dado estabilizará algunas proteínas y desestabilizará otras.

Los polisorbatos son sensibles a la degradación oxidativa y a menudo, tal como se suministran, contienen cantidades suficientes de peróxidos para provocar la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de proteína, especialmente la metionina. Por consiguiente, los polisorbatos se deben usar con cuidado y, cuando se usan, deben emplearse en su concentración eficaz más baja. A este respecto, los polisorbatos ejemplifican la norma general de que los excipientes se deben usar en sus concentraciones eficaces más bajas.

Realizaciones de las formulaciones de construcciones de anticuerpo de la invención comprenden además uno o más antioxidantes. Hasta cierto punto, se puede evitar la oxidación perjudicial de proteínas en formulaciones farmacéuticas al mantener niveles apropiados de oxígeno y temperatura ambientales y al evitar la exposición a la luz. También se pueden usar excipientes antioxidantes para evitar la degradación oxidativa de las proteínas. Entre los antioxidantes útiles a este respecto se encuentran los agentes reductores, los eliminadores de oxígeno/radicales libres y los agentes quelantes. Los antioxidantes para uso en formulaciones proteínicas terapéuticas según la invención preferiblemente son solubles en agua y mantienen su actividad durante toda la vida útil de un producto. El EDTA es un antioxidante preferido según la invención a este respecto. Los antioxidantes pueden dañar las proteínas. A modo de ejemplo, los agentes reductores, como la glutatona en particular, pueden alterar los enlaces disulfuro intramoleculares. Así, los antioxidantes para el uso en la invención se seleccionan para, entre otras cosas, eliminar o reducir suficientemente la posibilidad de que ellos mismos dañen las proteínas de la formulación.

Las formulaciones según la invención pueden incluir iones metálicos que son cofactores proteínicos y que son necesarios para formar complejos de coordinación de proteínas, tales como cinc necesario para formar ciertas suspensiones de insulina. Los iones metálicos también pueden inhibir algunos procesos que degradan proteínas. Sin embargo, los iones metálicos también catalizan procesos químicos que degradan proteínas. Se pueden usar iones magnesio (10-120 mM) para inhibir la isomerización de ácido aspártico en ácido isoaspártico. Los iones Ca^{+2} (hasta 100 mM) pueden incrementar la estabilidad de desoxirribonucleasa humana. Sin embargo, Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} pueden desestabilizar ADN asarh. De forma similar, Ca^{+2} y Sr^{+2} pueden estabilizar el Factor VIII, se puede desestabilizar por Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+2} , y su agregación se puede incrementar por iones Al^{+3} .

Realizaciones de formulaciones de las construcciones de anticuerpos de la invención comprenden además uno o más conservantes. Los conservantes son necesarios cuando se desarrollan formulaciones parenterales de múltiples dosis que implican más de una extracción del mismo recipiente. Su función principal es inhibir el crecimiento microbiano y asegurar la esterilidad del producto durante toda la vida útil o período de uso del producto farmacológico. Conservantes usado comúnmente incluyen alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes tienen una larga historia de uso con productos parenterales micromoleculares, el desarrollo de formulaciones proteínicas que incluyan conservantes puede ser un desafío. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizador (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor importante para limitar su uso en formulaciones proteínicas

de múltiples dosis. Hasta la fecha, la mayoría de los fármacos proteínicos se han formulado solamente para un uso individual. Sin embargo, cuando son posibles las formulaciones de múltiples dosis, tienen la ventaja adicional de permitir la comodidad del paciente y una mayor comercialización. Un buen ejemplo es el de la hormona del crecimiento humana (hGH), donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha llevado a la comercialización de presentaciones en pluma inyectable de múltiples usos más convenientes. Actualmente se encuentran disponibles en el mercado al menos cuatro de estos dispositivos de pluma que contienen formulaciones conservadas de hGH. Norditropin (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ (líquido, Genentech) y Genotropin (liofilizado, cartucho de doble cámara, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol, mientras que Somatropo (Eli Lilly) está formulado con m-cresol. Es necesario considerar varios aspectos durante la formulación y desarrollo de formas farmacéuticas conservadas. Se debe optimizar la concentración eficaz de conservante en el producto farmacológico. Esto requiere probar un conservante dado en la forma de dosificación con intervalos de concentración que confieren eficacia antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de las proteínas.

Como era de esperar, el desarrollo de formulaciones líquidas que contienen conservantes es más desafiante que el de las formulaciones liofilizadas. Los productos criosecados se pueden liofilizar sin el conservante y reconstituirse con un conservante que contenga diluyente en el momento del uso. Esto acorta el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con la proteína, minimizando significativamente los riesgos de estabilidad asociados. Con formulaciones líquidas, la eficacia y la estabilidad del conservante deben mantenerse durante toda la vida útil del producto (alrededor de 18 a 24 meses). Un punto importante a tener en cuenta es que la eficacia del conservante debe demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes excipientes.

Las construcciones de anticuerpo divulgadas en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o un tensioactivo que el útil para el aporte de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma están dispuestos comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición lipídica de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen la construcción de anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); las Pat. EE. UU. N° 4.485.045 y 4.544.545; y el documento WO 97/38731. Liposomas con un tiempo de circulación potenciado se divulgan en la Patente EE. UU. N° 5.013.556. Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' de la construcción de anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a los liposomas según se describe en Martin y cols. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está opcionalmente contenido dentro del liposoma. Véase Gabizon y cols. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

Una vez que la composición farmacéutica se ha formulado, se puede almacenar en viales estériles como solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, cristal o como polvo deshidratado o liofilizado. Estas formulaciones se pueden almacenar bien en forma lista para usar o bien en una forma (p. ej., liofilizada) que se reconstituya antes de la administración.

La actividad biológica de la composición farmacéutica definida en el presente documento se puede determinar a modo de ejemplo mediante ensayos de citotoxicidad, según se describe en los siguientes ejemplos, en el documento WO 99/54440 o por Schlereth y cols. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). La "eficacia" o "eficacia *in vivo*" según se usa en el presente documento se refiere a la respuesta a la terapia con la composición farmacéutica de la invención, usando, p. ej., criterios de respuesta de NCI estandarizados. El éxito o la eficacia *in vivo* de la terapia usando una composición farmacéutica de la invención se refiere a la efectividad de la composición para su fin pretendido, es decir la capacidad de la composición para provocar su efecto deseado, es decir el agotamiento de células patológicas, p. ej. células tumorales. La eficacia *in vivo* se puede verificar mediante métodos estándar establecidos para las entidades patológicas respectivas incluyendo, pero no limitados a, conteos de glóbulos blancos, diferenciales, clasificación de células activadas por fluorescencia, aspiración de la médula ósea. Además, se pueden usar diversos parámetros de la química clínica específicos de una enfermedad y otros métodos estándar establecidos. Además, se pueden usar tomografía asistida por ordenador, rayos X, tomografía de resonancia magnética nuclear (p. ej. para la valoración de una respuesta basada en los criterios del National Cancer Institute [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. abril 1999;17(4):1244]), tomografía de emisión positrónica, recuento de glóbulos blancos, diferenciales, clasificación de células activadas por fluorescencia, aspiración de la médula ósea, biopsias/histologías de ganglios linfáticos, y diversos parámetros de la química clínica específicos de linfomas (p. ej. lactato deshidrogenasa) y otros métodos estándar establecidos.

Otro desafío importante en el desarrollo de fármacos tales como la composición farmacéutica de la invención es la modulación predecible de las propiedades farmacocinéticas. Con este fin, se puede establecer un perfil farmacocinético del posible fármaco, es decir, un perfil de los parámetros farmacocinéticos que afectan a la capacidad de un fármaco particular para tratar una afección dada. Los parámetros farmacocinéticos del fármaco que influyen en

la capacidad de un fármaco para tratar cierta entidad patológica incluyen, pero no se limitan a: semivida, volumen de distribución, metabolismo hepático de primer paso y grado de unión al suero sanguíneo. La eficacia de un agente farmacológico dado puede verse influenciada por cada uno de los parámetros mencionados anteriormente.

"Semivida" significa el tiempo en el que el 50% de un fármaco administrado se elimina a través de procesos biológicos, p. ej. metabolismo, excreción, etc. Por "metabolismo hepático de primer paso" se entiende la propensión de un fármaco a ser metabolizado tras el primer contacto con el hígado, es decir, durante su primer paso a través del hígado. "Volumen de distribución" significa el grado de retención de un fármaco a través de los diversos compartimentos del organismo, como p. ej. espacios intracelulares y extracelulares, tejidos y órganos, etc. y la distribución del fármaco dentro de estos compartimentos. "Grado de unión al suero sanguíneo" significa la propensión de un fármaco a interactuar y unirse a proteínas del suero sanguíneo, tales como la albúmina, lo que lleva a una reducción o pérdida de la actividad biológica del fármaco.

Los parámetros farmacocinéticos también incluyen la biodisponibilidad, el tiempo de retardo (Tretardo), T_{máx}, las tasas de absorción, mayor inicio y/o C_{máx} para una cantidad dada de fármaco administrado. "Biodisponibilidad" significa la cantidad de un fármaco en el compartimento sanguíneo. "Tiempo de retardo" significa retraso temporal entre la administración del fármaco y su detección y mensurabilidad en sangre o plasma. "T_{máx}" es el tiempo después del cual se alcanza la concentración sanguínea máxima del fármaco, y "C_{máx}" es la concentración sanguínea obtenida de forma máxima con un fármaco dado. El tiempo necesario para alcanzar una concentración sanguínea o tisular del fármaco requerida para su efecto biológico está influenciado por todos los parámetros. Los parámetros farmacocinéticos de construcciones de anticuerpo biespecíficas que exhiben especificidad entre especies, que pueden determinarse en pruebas preclínicas con animales en primates distintos de chimpancés según se esboza anteriormente, también se indican, p. ej., en la publicación de Schlereth y cols. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12).

En una realización, la invención proporciona la construcción de un anticuerpo de la invención o la construcción de un anticuerpo producido según el procedimiento de la invención para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad de tipo melanoma o una enfermedad de tipo melanoma metastásico.

Las formulaciones descritas en el presente documento son útiles como composiciones farmacéuticas en el tratamiento, la mejora y/o la prevención de la afección médica patológica que se describe en el presente documento en un paciente que lo necesite. El término "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. El tratamiento incluye la aplicación o administración de la formulación al organismo, un tejido aislado o una célula de un paciente que tenga una enfermedad/trastorno, un síntoma de una enfermedad/trastorno o una predisposición hacia una enfermedad/trastorno, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, recuperarse de o afectar a la enfermedad, el síntoma de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

El término "mejora" según se usa en el presente documento se refiere a cualquier recuperación del estado patológico de un paciente que tiene melanoma/melanoma metastásico según se especifica en el presente documento, mediante la administración de una construcción de anticuerpo según la invención a un sujeto que lo necesite. Esta recuperación también puede verse como una desaceleración o parada de la progresión de la enfermedad de tipo melanoma (metastásico) del paciente. El término "prevención" según se usa en el presente documento significa evitar la aparición o reaparición de un paciente que tiene melanoma/melanoma metastásico según se especifica en el presente documento, mediante la administración de una construcción de anticuerpo según la invención a un sujeto que lo necesite.

El término "enfermedad" se refiere a cualquier afección que se beneficie del tratamiento con la construcción de anticuerpo o la composición farmacéutica descritos en el presente documento. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicos y agudos incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero a la enfermedad en cuestión. Una "enfermedad de tipo melanoma" es un tipo de cáncer de piel que se forma a partir de melanocitos. En el melanoma metastásico, las metástasis cerebrales son particularmente comunes, pero el término "enfermedad de tipo melanoma metastásico" también abarca metástasis en el hígado, los huesos, la piel, el corazón, el pulmón, el abdomen y los ganglios linfáticos (distantes).

En una realización preferida de la invención, la enfermedad de tipo melanoma o la enfermedad de tipo melanoma metastásico se selecciona del grupo que consiste en melanoma de extensión superficial (SSM), lentigo maligno (también conocido como "melanoma lentiginoso en piel dañada por el sol"), melanoma sobre lentigo maligno, melanoma lentiginoso acro, melanoma nodular (NM, incluyendo también el subtipo melanoma polipoide), melanoma mucoso, melanoma desmoplásico, melanoma amelanótico y melanoma de tejidos blandos.

La construcción de anticuerpo de la invención generalmente estará diseñada para vías y métodos de administración específicos, para dosis y frecuencias de administración específicas, para tratamientos específicos de enfermedades específicas, con intervalos de biodisponibilidad y persistencia, entre otras cosas. Los materiales de la composición se formulan preferiblemente en concentraciones que sean aceptables para la zona de administración.

Así, las formulaciones y composiciones pueden diseñarse según la invención para el aporte mediante cualquier vía de

administración adecuada. En el contexto de la presente invención, las vías de administración incluyen, pero no se limitan a

- vías tópicas (tales como epicutánea, inhalatoria, nasal, oftálmica, auricular/aural, vaginal, mucosa);
- vías enterales (tales como oral, gastrointestinal, sublingual, sublabial, bucal, rectal); y
- 5 • Vías parenterales (tales como intravenosa, intraarterial, intraósea, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular, epidural, intratecal, subcutánea, intraperitoneal, extraamniótica, intraarticular, intracardiaca, intradérmica, intralesional, intrauterina, intravesical, intravítrea, transdérmica, intranasal, transmucosa, intrasinovial, intraluminal).

Las composiciones farmacéuticas y la construcción de anticuerpo de esta invención son particularmente útiles para la administración parenteral, p. ej., aporte subcutáneo o intravenoso, por ejemplo mediante inyección tal como inyección en embolada, o mediante infusión tal como infusión continua.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar usando un dispositivo médico. Ejemplos de dispositivos médicos para administrar composiciones farmacéuticas se describen en las Patentes de EE. UU. Nº 4.475.196, 4.439.196, 4.447.224, 4.447. 233, 4.486.194, 4.487.603, 4.596.556, 4.790.824, 4.941.880, 5.064.413, 5.312.335, 5.312.335, 5.383.851 y 5.399.163.

En particular, la presente invención proporciona una administración ininterrumpida de la composición adecuada. Como ejemplo no limitativo, una administración ininterrumpida o sustancialmente ininterrumpida, es decir, continua puede realizarse mediante un pequeño sistema de bombeo usado por el paciente para dosificar el flujo de agente terapéutico al organismo del paciente. La composición farmacéutica que comprende la construcción de anticuerpo de la invención se puede administrar usando dichos sistemas de bombeo. Estos sistemas de bombeo son generalmente conocidos en la técnica y comúnmente dependen del intercambio periódico de cartuchos que contienen el agente terapéutico que se va a infundir. Cuando se intercambia el cartucho en este sistema de bombeo, puede producirse una interrupción temporal del flujo por lo demás ininterrumpido del agente terapéutico hacia el organismo del paciente. En este caso, la fase de administración anterior al reemplazo del cartucho y la fase de administración posterior al reemplazo del cartucho todavía se considerarían dentro del significado de que los medios y métodos farmacéuticos de la invención constituyen juntos una "administración ininterrumpida" de este agente terapéutico.

La administración continua o ininterrumpida de las construcciones de anticuerpo de la invención puede ser intravenosa o subcutánea por medio de un dispositivo de aporte de líquidos o un pequeño sistema de bombeo que incluye un mecanismo de conducción de líquido para expulsar el líquido fuera de un depósito y un mecanismo de accionamiento para accionar el mecanismo de conducción. Los sistemas de bombeo para administración subcutánea pueden incluir una aguja o una cánula para penetrar en la piel de un paciente y aportar la composición adecuada en el organismo del paciente. Dichos sistemas de bombeo pueden fijarse o unirse directamente a la piel del paciente independientemente de una vena, arteria o vaso sanguíneo, permitiendo de ese modo un contacto directo entre el sistema de bombeo y la piel del paciente. El sistema de bombeo se puede unir a la piel del paciente durante de 24 horas hasta varios días. El sistema de bombeo puede ser de pequeño tamaño con un depósito para volúmenes pequeños. Como ejemplo no limitativo, el volumen del depósito para la composición farmacéutica adecuada para ser administrada puede estar entre 0,1 y 50 ml.

La administración continua también puede ser transdérmica por medio de un parche que se lleva sobre la piel y se reemplaza a intervalos. Un experto en la técnica conoce sistemas de parche para el aporte de fármacos adecuados para este fin. Cabe señalar que la administración transdérmica es especialmente conveniente para la administración ininterrumpida, ya que el intercambio de un primer parche agotado se puede efectuar ventajosamente simultáneamente con la colocación de un nuevo segundo parche, por ejemplo sobre la superficie de la piel inmediatamente adyacente al primer parche agotado e inmediatamente antes de retirar el primer parche agotado. No surgen problemas de interrupción del flujo o fallo de la pila.

Si la composición farmacéutica ha sido liofilizada, el material liofilizado se reconstituye en primer lugar en un líquido apropiado antes de la administración. El material liofilizado puede reconstituirse en, p. ej., agua bacteriostática para inyección (BWI), solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o la misma formulación en la que se encontraba la proteína antes de la liofilización.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada que se puede determinar, p. ej., mediante estudios de aumento escalonado de la dosis mediante la administración de dosis crecientes de la construcción de anticuerpo de la invención que exhiben especificidad entre especies descrita en el presente documento a primates distintos de chimpancés, por ejemplo macacos. Como se indicó anteriormente, la construcción de anticuerpo de la invención que exhibe especificidad entre especies descrita en el presente documento puede usarse ventajosamente en forma idéntica en pruebas preclínicas en primates distintos de chimpancés y como fármaco en seres humanos. El régimen de dosificación será determinado por el médico responsable y factores clínicos. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluido el tamaño del paciente, la superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se administren simultáneamente.

El término "dosis eficaz" o "dosificación eficaz" se define como una cantidad suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el efecto deseado. El término "dosis terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades o dosis eficaces para este uso dependerán de la afección a tratar (la indicación), la construcción de anticuerpo aportada, el contexto y los objetivos terapéuticos, la gravedad de la enfermedad, la terapia previa, la anamnesis y la respuesta al agente terapéutico del paciente, la vía de administración, el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño de órganos) y/o condición (la edad y salud general) del paciente, y el estado general del propio sistema inmunitario del paciente. La dosis apropiada se puede ajustar según el criterio del médico responsable de modo que pueda administrarse al paciente una vez o a lo largo de una serie de administraciones, a fin de obtener el efecto terapéutico óptimo.

Una dosificación típica puede variar de alrededor de 0,1 µg/kg hasta alrededor de 30 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En realizaciones específicas, la dosificación puede variar de 1,0 µg/kg hasta alrededor de 20 mg/kg, opcionalmente de 10 µg/kg hasta alrededor de 10 mg/kg o de 100 µg/kg hasta alrededor de 5 mg/kg.

Una cantidad terapéutica eficaz de una construcción de anticuerpo de la invención preferiblemente da como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un incremento en la frecuencia o duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o discapacidad debidos al padecimiento de la enfermedad. Para tratar tumores que expresan CDH19, una cantidad terapéuticamente eficaz de la construcción de anticuerpo de la invención, p. ej. una construcción de anticuerpo anti-CDH19/anti-CD3, preferiblemente inhibe el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 80% o al menos alrededor de 90% en relación con pacientes no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral se puede evaluar en un modelo con animales para predecir la eficacia en tumores humanos.

La composición farmacéutica se puede administrar como único agente terapéutico o en combinación con terapias adicionales tales como terapias contra el cáncer según sea necesario, p. ej. otros fármacos proteínicos y no proteínicos. Estos fármacos se pueden administrar simultáneamente con la composición que comprende la construcción de anticuerpo de la invención según se define en el presente documento o separadamente antes o después de la administración de dicha construcción de anticuerpo en intervalos y dosis definidos en el tiempo.

El término "dosis eficaz y atóxica" según se usa en el presente documento se refiere a una dosis tolerable de una construcción de anticuerpo de la invención que sea suficientemente alta para provocar el agotamiento de células patológicas, la eliminación del tumor, la contracción del tumor o la estabilización de la enfermedad son o esencialmente sin efectos tóxicos importantes. Estas dosis eficaces y atóxicas se pueden determinar, p. ej., mediante estudios de aumento escalonado de la dosis descritos en la técnica y deben estar por debajo de la dosis que induzca episodios secundarios adversos intensos (toxicidad limitante de la dosis, DLT).

El término "toxicidad" según se usa en el presente documento se refiere a los efectos tóxicos de un fármaco manifestado en episodios adversos o episodios adversos intensos. Estos episodios adversos podrían referirse a una falta de tolerabilidad del fármaco en general y/o una falta de tolerancia local después de la administración. La toxicidad también podría incluir efectos teratogénicos o carcinogénicos provocados por el fármaco.

El término "seguridad", "seguridad *in vivo*" o "tolerabilidad" según se usa en el presente documento define la administración de un fármaco sin inducir episodios adversos intensos directamente después de la administración (tolerancia local) y durante un período más largo de aplicación del fármaco. Las "seguridad", "seguridad *in vivo*" o "tolerabilidad" se puede evaluar, p. ej., a intervalos regulares durante el período de tratamiento y seguimiento. Las mediciones incluyen evaluación clínica, p. ej. manifestaciones orgánicas, y el cribado de anomalías de laboratorio. La evaluación clínica se puede llevar a cabo y las desviaciones de los hallazgos normales se registran/codifican según los estándares NCI-CTC y/o MedDRA. Las manifestaciones orgánicas pueden incluir criterios tales como alergia/inmunología, sangre/médula ósea, arritmia cardíaca, coagulación y similares, como se indica, p. ej., en the Common Terminology Criteria for adverse events v3.0 (CTCAE). Parámetros de laboratorio que se pueden analizar incluyen, a modo de ejemplo, hematología, química clínica, perfil de coagulación y análisis de orina y examen de otros líquidos corporales tales como suero, plasma, líquido linfático o espinal, líquido amniótico y similares. Así, la seguridad se puede valorar, p. ej. mediante examen físico, técnicas de obtención de imágenes (es decir ultrasonidos, rayos X, tomografías digitales, obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), otras medidas con dispositivos técnicos (es decir electrocardiograma), signos vitales, mediante medición de parámetros de laboratorio y registro de episodios adversos. Por ejemplo, los episodios adversos en primates distintos de chimpancés en los usos y métodos según la invención se pueden examinar mediante métodos histopatológicos y/o histoquímicos.

También se hace referencia a los términos anteriores, p. ej., en the Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; congreso del ICH Steering Committee el 16 de julio de 1997.

En una realización adicional, la invención proporciona un estuche que comprende una construcción de anticuerpo de la invención, una construcción de anticuerpo producida según el procedimiento de la invención, un vector de la

invención y/o a célula anfitriona de la invención.

En el contexto de la presente invención, el término "estuche" significa dos o más componentes – uno de los cuales corresponde a la construcción de anticuerpo, la composición farmacéutica, el vector o la célula anfitriona de la invención – envasados conjuntamente en un envase, recipiente u otro. De ahí que un estuche se pueda describir como un conjunto de productos y/o utensilios que son suficientes para conseguir un cierto objetivo, que se pueden comercializar como una sola unidad.

El estuche puede comprender uno o más recipientes (tales como viales, ampollas, envases, jeringas, botellas, bolsas) de cualquier conformación, tamaño y material apropiados (preferiblemente impermeable, p. ej. plástico o vidrio) que contiene la construcción de anticuerpo o la composición farmacéutica de la presente invención en una dosificación apropiada para la administración (véase anteriormente). El estuche puede contener adicionalmente directrices para el uso (p. ej. en forma de un folleto o manual de instrucciones), medios para administrar la construcción de anticuerpo de la presente invención tales como una jeringa, bomba, infusor o similares, medios para reconstituir la construcción de anticuerpo de la invención y/o medios para diluir la construcción de anticuerpo de la invención.

La invención también proporciona estuches para una unidad de administración de una sola dosis. El estuche de la invención también puede contener un primer recipiente que comprende una construcción de anticuerpo secada / liofilizada y un segundo recipiente que comprende una formulación acuosa. En ciertas realizaciones de esta invención, se proporcionan estuches que contienen jeringas precargadas de una sola cámara y de múltiples cámaras (p. ej., jeringas para líquidos y liojeringas).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Unión de anticuerpos BiTE específicos de CDH19 a células HEK293 que expresan CDH19 humano. Se usó sobrenadante de cultivo de células CHO como el reactivo de la primera etapa para una tinción por inmunofluorescencia de células HEK293 que expresan CDH19 humano, seguido de detección con un anti-His murino y un anticuerpo antimurino conjugado a ficoeritrina. La fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo.

Figura 2: Unión de anticuerpos BiTE específicos de CDH19 a células HEK293 que expresan CDH19 de macaco cangrejero. Se usó sobrenadante de cultivo de células CHO como el reactivo de la primera etapa para una tinción por inmunofluorescencia de células HEK293 que expresan CDH19 de macaco cangrejero, seguido de detección con un anti-His murino y un anticuerpo antimurino conjugado a ficoeritrina. La fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo.

Figura 3: Unión de anticuerpos BiTE específicos de CDH19 a células HEK293 no transfectadas. Se usó sobrenadante de cultivo de células CHO como el reactivo de la primera etapa para una tinción por inmunofluorescencia de células HEK293 no transfectadas, seguido de detección con un anti-His murino y un anticuerpo antimurino conjugado a ficoeritrina. La fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo.

Figura 4: Unión de anticuerpos BiTE específicos de CDH19 a la línea celular CHL-1. Se usó sobrenadante de cultivo de células CHO como el reactivo de la primera etapa para una tinción por inmunofluorescencia de células CHL-1, seguido de detección con un anti-His murino y un anticuerpo antimurino conjugado a ficoeritrina. La fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo.

Figura 5: Construcciones quiméricas de ser humano y/o pollo usadas para la predicción de epítopos para los de unión a CDH19 de la invención.

A = huCDH19(44-772) (véase SEQ ID NO: 1843)

J = ckCDH19(44-776) (véase SEQ ID NO: 1837)

K = huCDH19(44-141)::ckCDH19(142-776) (véase SEQ ID NO: 1838)

L = ckCDH19(44-141)::huCDH19(142-249)::ckCDH19(250-776) (véase SEQ ID NO: 1839)

M = ckCDH19(44-249)::huCDH19(250-364)::ckCDH19(365-776) (véase SEQ ID NO: 1840)

N = ckCDH19(44-364)::huCDH19(365-463)::ckCDH19(469-776) (véase SEQ ID NO: 1841)

O = ckCDH19(44-468)::huCDH19(464-772) (véase SEQ ID NO: 1842)

Figura 6: Agrupación de epítopos de scFv de anti-CDH19 mediante citometría de flujo

En construcciones quiméricas de CDH19 de pollo/ser humano que comparten ejemplos representativos de cada agrupación de epítopos encontrados dentro de la totalidad de los aglutinantes de CDH19 probados. Se usaron células HEK transfectadas con CDH19 de pollo o ser humano, o con moléculas quiméricas de CDH19, para la cartografía epitópica de extractos periplásmicos que contienen anti-scFv de CDH19 de ser humano y macaco. Los scFv unidos se detectaron con un anticuerpo anti-HIS y un anticuerpo específico anti-Fc gamma de ratón etiquetado con PE.

Izquierda: designación de scFv de CDH19, fila superior: término de células HEK transfectadas. Figuras del histograma: cuadro rojo: ganancia de unión debido al intercambio de la secuencia de CDH19 de pollo por la secuencia de CDH19 humano homóloga identificando así el epítipo o parte del epítipo del scFv probado. Abreviaturas: wt: silvestre, hu: ser humano, ck: pollo.

5 Ejemplos:

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar realizaciones o particularidades específicas de la presente invención. No se debe considerar que estos ejemplos limiten el alcance de esta invención. Los ejemplos se incluyen con fines de ilustración, y la presente invención solo está limitada por las reivindicaciones.

Ejemplo 1

10 Reactividad cruzada de CDH19 entre especies

Para confirmar la unión a CDH19 humano y de macaco cangrejero, se probaron 46 anticuerpos BiTE para CDH19 diferentes mediante citometría de flujo usando las siguientes líneas celulares: i) células HEK293 transfectadas con CDH19 humano identificado por FLAG N-terminalmente, ii) células HEK293 transfectadas con CDH19 de macaco cangrejero identificado con FLAG N-terminalmente, iii) células HEK293 no transfectadas, iv) la línea celular de melanoma humano CHL-1 que expresa CDH19 humano natural (Tabla 1).

Para la citometría de flujo, se incubaron 200.000 células de las respectivas líneas celulares en hielo durante 30 minutos con 50 µl de sobrenadante de cultivo de células CHO que contenía moléculas de BiTE secretadas. Se usó como control negativo el sobrenadante del cultivo celular de células no transfectadas. Las células se lavaron dos veces en PBS/FCS al 1 %/azida Na al 0,05% y la unión de las construcciones se detectó con un anticuerpo anti-His murino (clon AD1.1.10, AbD Serotec), diluido 1:1000 en 50 µl de PBS/FCS al 1%/azida Na al 0,05%). Después del lavado, los anticuerpos anti-His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma de ratón (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS/FCS al 1%/azida Na al 0,05%. Las señales de fluorescencia de las células se midieron mediante citometría de flujo en un instrumento FACSCanto II y se analizaron mediante el software FACSDiva (ambos de Becton Dickinson).

Como resultado, los anticuerpos biespecíficos para CDH19/CD3 tiñeron células HEK293 transfectadas con CDH19 humano, CDH19 de macaco cangrejero y la línea celular de melanoma CHL-1 que expresa CDH19 humano. Por otra parte, no se pudo observar tinción de células HEK293 no transfectadas (véase la Figura - Figura). El anticuerpo BiTE 23 muestra solo una unión débil a células HEK293 que expresan CDH19 humano o CDH19 de macaco cangrejero, pero una unión clara a células CHL-1 que indica un epítipo de CDH19 N-terminal que puede ser alterado por la etiqueta N-FLAG de las proteínas CDH19 expresadas recombinantemente en las respectivas células HEK293 transfectadas.

Tabla 1: Anticuerpos BiTE para CDH19 y números asignados.

Nombre del anticuerpo BiTE	Número del anticuerpo BiTE	Nombre del anticuerpo BiTE	Número del anticuerpo BiTE
CH19_4-H8	1	CH19_5-G4	24
CH19_6-A7	2	CH19_8-F6	25
CH19_6-B8	3	CH19_0-G9	26
CH19_6-C12	4	CH19 2-A10	27
CH19_6-E12	5	CH19 2-D9	28
CH19_6-F9	6	CH19_2-H7	29
CH19_6-G8	7	CH19_0-E11	30
CH19_4-A7	8	CH19_1-E11	31
CH19_9-F1	9	CH19 8-H6	32
CH19_9-F9	10	CH19_8-H7	33

Nombre del anticuerpo BiTE	Número del anticuerpo BiTE	Nombre del anticuerpo BiTE	Número del anticuerpo BiTE
CH19_0-B4	11	CH19_9-C2	34
CH19_0-C11	12	CH19_9-F3	35
CH19_1-H8	13	CH19_0-F5	36
CH19_2-E4	14	CH19_1-E1	37
CH19_0-B8	15	CH19_1-E6	38
CH19_0-C4	16	CH19_3-B10	39
CH19_0-G4	17	CH19_3-F2	40
CH19_0-H5	18	CH19_2-C11	41
CH19_1-B12	19	CH19_3-D5	42
CH19_1-D11	20	CH19_5-B3	43
CH19_1-G11	21	CH19_5-E10	44
CH19_1-H11	22	CH19_6-G10	45
CH19_2-G6	23	CH19_203-VKG	46

Ejemplo 2

Actividad citotóxica

Etiquetado de células diana

5 Para el análisis de la lisis celular en ensayos de citometría de flujo, se usó el colorante para membranas fluorescentes DiOC₁₈ (DiO) (Molecular Probes, N° V22886) para etiquetar células CHO positivas a CDH19 de macaco cangrejero - como células diana y distinguirlas de células efectoras. Brevemente, las células se recogieron, se lavaron una vez con PBS y se ajustaron hasta 10⁶ células/ml en PBS que contenía 2% (v/v) de FBS y el tinte para membranas DiO (5 µl/10⁶ células). Después de la incubación durante 3 minutos a 37°C, las células se lavaron dos veces en medio RPMI completo y el número de células se ajustó a 1,25 x 10⁵ células/ml. La vitalidad de las células se determinó usando una solución isotónica de EosinG al 0,5 % (v/v) (Roth, n° 45380).

Análisis basado en citometría de flujo.

Este ensayo se diseñó para cuantificar la lisis de células CHO transfectadas con CDH19 de macaco cangrejero en presencia de diluciones en serie de anticuerpos biespecíficos para CDH19.

15 Se mezclaron volúmenes iguales de células diana y células efectoras etiquetadas con DiO (es decir línea celular T de macaco que expresa CD3, 4119LnPx), dando como resultado una relación de células E:T de 10:1. Se transfirieron 160 µL de esta suspensión a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se añadieron 40 µl de diluciones en serie de los anticuerpos biespecíficos para CDH19 y un control negativo biespecífico (un anticuerpo biespecífico basado en CD3 que reconoce un antígeno diana irrelevante) o medio completo RPMI como control negativo adicional. La reacción citotóxica mediada por anticuerpos biespecíficos se desarrolló durante 48 horas en una incubadora humidificada con CO₂ al 7%. A continuación, las células se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos y se verificó la pérdida de integridad de la membrana de la célula diana añadiendo yoduro de propidio (PI) a una concentración final de 1 µg/ml. El PI es un tinte impermeable a la membrana que normalmente se excluye de las células viables, mientras que las células muertas lo absorben y se vuelven identificables mediante emisión fluorescente.

25 Las muestras se midieron mediante citometría de flujo en un instrumento FACSCanto II y se analizaron mediante el software FACSDiva (ambos de Becton Dickinson).

Las células diana se identificaron como células positivas a DiO. Las células diana negativas a PI se clasificaron como células diana vivas. El porcentaje de citotoxicidad se calculó según la siguiente fórmula:

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

n = número de episodios

- 5 Usando el *software* GraphPad Prism 6 (Graph Pad Software, San Diego), se representó gráficamente el porcentaje de citotoxicidad frente a las concentraciones de anticuerpos biespecíficos correspondientes. Las curvas de respuesta a la dosis se analizaron con los cuatro modelos de regresión logística paramétrica para la evaluación de las curvas de respuesta a la dosis sigmoideas con pendiente de Hill fija y se calcularon los valores de EC50.

Ejemplo 3

- 10 Predicción epitópica mediante quimeras de cadherina-19 de ser humano/pollo

La unión al dominio se determinó mediante citometría de flujo en células 293T transfectadas transitoriamente con plásmidos que consisten en reemplazos simples de dominios repetidos de cadherina de CDH19 humano en el esqueleto de cadherina 19 de pollo clonado en el vector de expresión pTT5 inmediatamente precedido por secuencias líderes de CDH19 humano o de pollo naturales y una etiqueta Flag. El experimento incluía ensayar un subconjunto de anticuerpos anti-CDH19 contra cadherina 19 de pollo para determinar la idoneidad para el agrupamiento en estas quimeras de ser humano/pollo.

- 15 El siguiente ensayo de unión se completó en placas de fondo en V de 96 pocillos. Se incubaron 50.000 células 293T transfectadas transitoriamente con extractos periplásmicos que contenían scFv que se une unido a CDH19 humano y de macaco. Los scFv unidos se detectaron con 1 µg/ml de un anticuerpo monoclonal murino anti-HIS (AbD Serotec MCA1396). Después del lavado, se detectaron anticuerpos anti-His unidos con un anticuerpo específico de Fc gamma conjugado con ficoeritrina (Jackson-Immuno-Research 115-116-071) diluido 1:100.

- 20 A continuación, las células se lavaron una vez y se midieron mediante citometría de flujo en un instrumento FACS Calibur (Becton Dickinson) y se analizaron mediante el *software* FlowJo (Versión 7.6).

- 25 Los experimentos incluían controles de HEK 293. Como control negativo, las células se incubaron en PBS con FCS al 2% en lugar de extractos periplásmicos que contenían anti-scFv de CDH19.

La etiqueta FLAG se detectó con 1 µg/ml de un anticuerpo FLAG M2 (Sigma F1804) seguido de un anticuerpo específico de Fc gamma conjugado con ficoeritrina (Jackson-Immuno-Research 115-116-071).

- 30 Los anticuerpos usados para este ensayo (anticuerpo anti-HIS (AbD Serotec MCA1396), anticuerpo FLAG M2 (Sigma F1804) y el anticuerpo específico de Fc gamma etiquetado con PE (Jackson-Immuno-Research 115-116-071) se diluyeron en PBS con FCS al 2%. Las células se incubaron con los respectivos anticuerpos durante 30 minutos a 4°C.

Los datos de estos experimentos se presentan en las figuras 5 y 6. La Tabla 2 resume la conclusión de esos ensayos para las construcciones de anticuerpo de la invención.

Tabla 2: Predicción de agrupaciones de epítopos para construcción de anticuerpos para CDH19 de la invención

Clon	Agrupamiento de epítopos	Clon	Agrupamiento de epítopos
CH19_2G6_302_VKGxI2C6	E3	CH19_2-H7xI2C6	E1
CH19_0-E11xI2C6	E1	CH19_5-B3xI2C6	E3
CH19_5-G4xI2C6	E1	CH19_5-E10xI2C6	E3
CH19_8-H6xI2C6	E1	CH19_6-G10xI2C6	E3
CH19_2-C11xI2C6	E1	CH19_4-H8xI2C6	E3
CH19_2-A10xI2C6	E1	CH19_2-E4xI2C6	E3

CH19_1-D11 xI2C6	E1	CH19_6-B8xI2C6	E3
CH19_9-F9xI2C6	E1	CH19_0-B4xI2C6	E3
CH19_1-H8xI2C6	E1	CH19_9-F1xI2C6	E3
CH19_1-B12xI2C6	E1	CH19_4-A7xI2C6	E3
CH19_0-C4xI2C6	E1	CH19_6-E12xI2C6	E3
CH19_3-F2xI2C6	E1	CH19_6-C12xI2C6	E3
CH19_3-B10xI2C6	E1	CH19_6-A7xI2C6	E3
CH19_0-G4xI2C6	E1	CH19_6-G8xI2C6	E3
CH19_0-H5xI2C6	E1	CH19_6-F9xI2C6	E3
CH19_0-B8xI2C6	E1	CH19_0-C11xI2C6	E1
CH19_2-D9xI2C6	E1	CH19_8-F6xI2C6	E1
CH19_8-H7xI2C6	E1	CH19_0-G9xI2C6	E1
CH19_9-C2xI2C6	E1	CH19_1-E11xI2C6	E1
CH19_3-D5xI2C6	E1	CH19_0-F5xI2C6	E1
CH19_1-G11xI2C6	E1	CH19_1-E1xI2C6	E1
CH19_1-H11xI2C6	E1	CH19_1-E6xI2C6	E1
CH19_9-F3xI2C6	E1	CH19_2G6_302xI2C6	E3
CH19_2-G6xI2C6	E1		

La siguiente tabla proporciona identificadores y descripciones de secuencias para las secuencias proporcionadas en la lista de secuencias (la tabla se puede leer desplazándose hacia abajo por cada columna y avanzando de izquierda a derecha a través de las columnas en una página dada).

5 **Tabla de secuencias**

Ab	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CH19_2G6_302_VKGxI2C6	(SEQ ID 1)	(SEQ ID 2)	(SEQ ID 3)	(SEQ ID 4)	(SEQ ID 5)	(SEQ ID 6)
CH19_0-E11xI2C6	(SEQ ID 14)	(SEQ ID 15)	(SEQ ID 16)	(SEQ ID 17)	(SEQ ID 18)	(SEQ ID 19)
CH19_5-G4xI2C6	(SEQ ID 27)	(SEQ ID 28)	(SEQ ID 29)	(SEQ ID 30)	(SEQ ID 31)	(SEQ ID 32)
CH19_8-H6xI2C6	(SEQ ID 40)	(SEQ ID 41)	(SEQ ID 42)	(SEQ ID 43)	(SEQ ID 44)	(SEQ ID 45)
CH19_2-C11xI2C6	(SEQ ID 53)	(SEQ ID 54)	(SEQ ID 55)	(SEQ ID 56)	(SEQ ID 57)	(SEQ ID 58)
CH19_2-A10xI2C6	(SEQ ID 66)	(SEQ ID 67)	(SEQ ID 68)	(SEQ ID 69)	(SEQ ID 70)	(SEQ ID 71)
CH19_1-D11 xI2C6	(SEQ ID 79)	(SEQ ID 80)	(SEQ ID 81)	(SEQ ID 82)	(SEQ ID 83)	(SEQ ID 84)
CH19_9-F9xI2C6	(SEQ ID 92)	(SEQ ID 93)	(SEQ ID 94)	(SEQ ID 95)	(SEQ ID 96)	(SEQ ID 97)
CH19_1-H8xI2C6	(SEQ ID 105)	(SEQ ID 106)	(SEQ ID 107)	(SEQ ID 108)	(SEQ ID 109)	(SEQ ID 110)
CH19_1-B12xI2C6	(SEQ ID 118)	(SEQ ID 119)	(SEQ ID 120)	(SEQ ID 121)	(SEQ ID 122)	(SEQ ID 123)
CH19_0-C4xI2C6	(SEQ ID 131)	(SEQ ID 132)	(SEQ ID 133)	(SEQ ID 134)	(SEQ ID 135)	(SEQ ID 136)
CH19_3-F2xI2C6	(SEQ ID 144)	(SEQ ID 145)	(SEQ ID 146)	(SEQ ID 147)	(SEQ ID 148)	(SEQ ID 149)
CH19_3-B10xI2C6	(SEQ ID 157)	(SEQ ID 158)	(SEQ ID 159)	(SEQ ID 160)	(SEQ ID 161)	(SEQ ID 162)
CH19_0-G4xI2C6	(SEQ ID 170)	(SEQ ID 171)	(SEQ ID 172)	(SEQ ID 173)	(SEQ ID 174)	(SEQ ID 175)

ES 2 973 788 T3

CH19_0-H5xI2C6	(SEQ ID 183)	(SEQ ID 184)	(SEQ ID 185)	(SEQ ID 186)	(SEQ ID 187)	(SEQ ID 188)
CH19_0-B8xI2C6	(SEQ ID 196)	(SEQ ID 197)	(SEQ ID 198)	(SEQ ID 199)	(SEQ ID 200)	(SEQ ID 201)
CH19_2-D9xI2C6	(SEQ ID 209)	(SEQ ID 210)	(SEQ ID 211)	(SEQ ID 212)	(SEQ ID 213)	(SEQ ID 214)
CH19_8-H7xI2C6	(SEQ ID 222)	(SEQ ID 223)	(SEQ ID 224)	(SEQ ID 225)	(SEQ ID 226)	(SEQ ID 227)
CH19_9-C2xI2C6	(SEQ ID 235)	(SEQ ID 236)	(SEQ ID 237)	(SEQ ID 238)	(SEQ ID 239)	(SEQ ID 240)
CH19_3-D5xI2C6	(SEQ ID 248)	(SEQ ID 249)	(SEQ ID 250)	(SEQ ID 251)	(SEQ ID 252)	(SEQ ID 253)
CH19_1-G11xI2C6	(SEQ ID 261)	(SEQ ID 262)	(SEQ ID 263)	(SEQ ID 264)	(SEQ ID 265)	(SEQ ID 266)
CH19_1-H11xI2C6	(SEQ ID 274)	(SEQ ID 275)	(SEQ ID 276)	(SEQ ID 277)	(SEQ ID 278)	(SEQ ID 279)
CH19_9-F3xI2C6	(SEQ ID 287)	(SEQ ID 288)	(SEQ ID 289)	(SEQ ID 290)	(SEQ ID 291)	(SEQ ID 292)
CH19_2-G6xI2C6	(SEQ ID 300)	(SEQ ID 301)	(SEQ ID 302)	(SEQ ID 303)	(SEQ ID 304)	(SEQ ID 305)
CH19_2-H7xI2C6	(SEQ ID 313)	(SEQ ID 314)	(SEQ ID 315)	(SEQ ID 316)	(SEQ ID 317)	(SEQ ID 318)
CH19_5-B3xI2C6	(SEQ ID 326)	(SEQ ID 327)	(SEQ ID 328)	(SEQ ID 329)	(SEQ ID 330)	(SEQ ID 331)
CH19_5-E10xI2C6	(SEQ ID 339)	(SEQ ID 340)	(SEQ ID 341)	(SEQ ID 342)	(SEQ ID 343)	(SEQ ID 344)
CH19_6-G10xI2C6	(SEQ ID 352)	(SEQ ID 353)	(SEQ ID 354)	(SEQ ID 355)	(SEQ ID 356)	(SEQ ID 357)
CH19_4-H8xI2C6	(SEQ ID 365)	(SEQ ID 366)	(SEQ ID 367)	(SEQ ID 368)	(SEQ ID 369)	(SEQ ID 370)
CH19_2-E4xI2C6	(SEQ ID 378)	(SEQ ID 379)	(SEQ ID 380)	(SEQ ID 381)	(SEQ ID 382)	(SEQ ID 383)
CH19_6-B8xI2C6	(SEQ ID 391)	(SEQ ID 392)	(SEQ ID 393)	(SEQ ID 394)	(SEQ ID 395)	(SEQ ID 396)
CH19_0-B4xI2C6	(SEQ ID 404)	(SEQ ID 405)	(SEQ ID 406)	(SEQ ID 407)	(SEQ ID 408)	(SEQ ID 409)
CH19_9-F1xI2C6	(SEQ ID 417)	(SEQ ID 418)	(SEQ ID 419)	(SEQ ID 420)	(SEQ ID 421)	(SEQ ID 422)
CH19_4-A7xI2C6	(SEQ ID 430)	(SEQ ID 431)	(SEQ ID 432)	(SEQ ID 433)	(SEQ ID 434)	(SEQ ID 435)
CH19_6-E12xI2C6	(SEQ ID 443)	(SEQ ID 444)	(SEQ ID 445)	(SEQ ID 446)	(SEQ ID 447)	(SEQ ID 448)
CH19_6-C12xI2C6	(SEQ ID 456)	(SEQ ID 457)	(SEQ ID 458)	(SEQ ID 459)	(SEQ ID 460)	(SEQ ID 461)
CH19_6-A7xI2C6	(SEQ ID 469)	(SEQ ID 470)	(SEQ ID 471)	(SEQ ID 472)	(SEQ ID 473)	(SEQ ID 474)
CH19_6-G8xI2C6	(SEQ ID 482)	(SEQ ID 483)	(SEQ ID 484)	(SEQ ID 485)	(SEQ ID 486)	(SEQ ID 487)
CH19_6-F9xI2C6	(SEQ ID 495)	(SEQ ID 496)	(SEQ ID 497)	(SEQ ID 498)	(SEQ ID 499)	(SEQ ID 500)
CH19_0-C11xI2C6	(SEQ ID 508)	(SEQ ID 509)	(SEQ ID 510)	(SEQ ID 511)	(SEQ ID 512)	(SEQ ID 513)
CH19_8-F6xI2C6	(SEQ ID 521)	(SEQ ID 522)	(SEQ ID 523)	(SEQ ID 524)	(SEQ ID 525)	(SEQ ID 526)
CH19_0-G9xI2C6	(SEQ ID 534)	(SEQ ID 535)	(SEQ ID 536)	(SEQ ID 537)	(SEQ ID 538)	(SEQ ID 539)
CH19_1-E11xI2C6	(SEQ ID 547)	(SEQ ID 548)	(SEQ ID 549)	(SEQ ID 550)	(SEQ ID 551)	(SEQ ID 552)
CH19_0-F5xI2C6	(SEQ ID 560)	(SEQ ID 561)	(SEQ ID 562)	(SEQ ID 563)	(SEQ ID 564)	(SEQ ID 565)
CH19_1-E1xI2C6	(SEQ ID 573)	(SEQ ID 574)	(SEQ ID 575)	(SEQ ID 576)	(SEQ ID 577)	(SEQ ID 578)
CH19_1-E6xI2C6	(SEQ ID 586)	(SEQ ID 587)	(SEQ ID 588)	(SEQ ID 589)	(SEQ ID 590)	(SEQ ID 591)
CH19_2G6_30 2xI2C6	(SEQ ID 599)	(SEQ ID 600)	(SEQ ID 601)	(SEQ ID 602)	(SEQ ID 603)	(SEQ ID 604)

ES 2 973 788 T3

Ab	LC V-region	HC V-region
CH19_2G6_302_VKGxl2C6	(SEQ ID 9)	(SEQ ID 7)
	(SEQ ID 10)	(SEQ ID 8)
CH19_0-E11xl2C6	(SEQ ID 22)	(SEQ ID 20)
CH19_5-G4xl2C6	(SEQ ID 23)	(SEQ ID 21)
CH19_8-H6xl2C6	(SEQ ID 35)	(SEQ ID 33)
CH19_2-C11xl2C6	(SEQ ID 36)	(SEQ ID 34)
CH19_2-A10xl2C6	(SEQ ID 48)	(SEQ ID 46)
CH19_1-D11 xl2C6	(SEQ ID 49)	(SEQ ID 47)
CH19_9-F9xl2C6	(SEQ ID 61)	(SEQ ID 59)
CH19_1-H8xl2C6	(SEQ ID 62)	(SEQ ID 60)
CH19_1-B12xl2C6	(SEQ ID 74)	(SEQ ID 72)
CH19_0-C4xl2C6	(SEQ ID 75)	(SEQ ID 73)
	(SEQ ID 87)	(SEQ ID 85)
	(SEQ ID 88)	(SEQ ID 86)
	(SEQ ID 100)	(SEQ ID 98)
	(SEQ ID 101)	(SEQ ID 99)
	(SEQ ID 113)	(SEQ ID 111)
	(SEQ ID 114)	(SEQ ID 112)
	(SEQ ID 126)	(SEQ ID 124)
	(SEQ ID 127)	(SEQ ID 125)
	(SEQ ID 139)	(SEQ ID 137)
	(SEQ ID 140)	(SEQ ID 138)

Ab	LC V-region	HC V-region
CH19_3-F2xl2C6	(SEQ ID 152)	(SEQ ID 150)
CH19_3-	(SEQ ID 153)	(SEQ ID 151)
CH19_3-	(SEQ ID 165)	(SEQ ID 163)

Ab	LC V-region	HC V-region
B10xl2C6	(SEQ ID 166)	(SEQ ID 164)
CH19_0-G4xl2C6	(SEQ ID 178)	(SEQ ID 176)
	(SEQ ID 179)	(SEQ ID 177)
CH19_0-H5xl2C6	(SEQ ID 191)	(SEQ ID 189)
	(SEQ ID 192)	(SEQ ID 190)
CH19_0-B8xl2C6	(SEQ ID 204)	(SEQ ID 202)
	(SEQ ID 205)	(SEQ ID 203)
CH19_2-D9xl2C6	(SEQ ID 217)	(SEQ ID 215)
CH19_8-H7xl2C6	(SEQ ID 218)	(SEQ ID 216)
	(SEQ ID 230)	(SEQ ID 228)
	(SEQ ID 231)	(SEQ ID 229)
CH19_9-C2xl2C6	(SEQ ID 243)	(SEQ ID 241)
	(SEQ ID 244)	(SEQ ID 242)
CH19_3-D5xl2C6	(SEQ ID 256)	(SEQ ID 254)
	(SEQ ID 257)	(SEQ ID 255)

Ab	LC V-region	HC V-region
CH19_1-G11xl2C6	(SEQ ID 269)	(SEQ ID 267)
	(SEQ ID 270)	(SEQ ID 268)
CH19_1-H11xl2C6	(SEQ ID 282)	(SEQ ID 280)
	(SEQ ID 283)	(SEQ ID 281)
CH19_9-F3xl2C6	(SEQ ID 295)	(SEQ ID 293)
	(SEQ ID 296)	(SEQ ID 294)

Ab	LC V-region	HC V-region
CH19_2-G6xl2C6	(SEQ ID 308)	(SEQ ID 306)
	(SEQ ID 309)	(SEQ ID 307)
CH19_2-H7xl2C6	(SEQ ID 321)	(SEQ ID 319)
	(SEQ ID 322)	(SEQ ID 320)
CH19_5-B3xl2C6	(SEQ ID 334)	(SEQ ID 332)
	(SEQ ID 335)	(SEQ ID 333)
CH19_5-E10xl2C6	(SEQ ID 347)	(SEQ ID 345)
CH19_6-G10xl2C6	(SEQ ID 348)	(SEQ ID 346)
	(SEQ ID 360)	(SEQ ID 358)
CH19_4-H8xl2C6	(SEQ ID 361)	(SEQ ID 359)
	(SEQ ID 373)	(SEQ ID 371)
CH19_2-E4xl2C6	(SEQ ID 374)	(SEQ ID 372)
	(SEQ ID 386)	(SEQ ID 384)
	(SEQ ID 387)	(SEQ ID 385)

Ab	LC V-region	HC V-region
CH19_6-B8xl2C6	(SEQ ID 399)	(SEQ ID 397)
	(SEQ ID 400)	(SEQ ID 398)
CH19_0-B4xl2C6	(SEQ ID 412)	(SEQ ID 410)
	(SEQ ID 413)	(SEQ ID 411)
CH19_9-F1xl2C6	(SEQ ID 425)	(SEQ ID 423)
	(SEQ ID 426)	(SEQ ID 424)
CH19_4-A7xl2C6	(SEQ ID 438)	(SEQ ID 436)
	(SEQ ID 439)	(SEQ ID 437)
CH19_6-E12xl2C6	(SEQ ID 451)	(SEQ ID 449)
	(SEQ ID 452)	(SEQ ID 450)
CH19_6-	(SEQ ID 464)	(SEQ ID 462)

Ab	LC V-region	HC V-region
C12xl2C6	(SEQ ID 465)	(SEQ ID 463)
CH19_6-A7xl2C6	(SEQ ID 477)	(SEQ ID 475)
	(SEQ ID 478)	(SEQ ID 476)
CH19_6-G8xl2C6	(SEQ ID 490)	(SEQ ID 488)
	(SEQ ID 491)	(SEQ ID 489)
CH19_6-F9xl2C6	(SEQ ID 503)	(SEQ ID 501)
	(SEQ ID 504)	(SEQ ID 502)
CH19_0-C11xl2C6	(SEQ ID 516)	(SEQ ID 514)
	(SEQ ID 517)	(SEQ ID 515)
CH19_8-F6xl2C6	(SEQ ID 529)	(SEQ ID 527)
	(SEQ ID 530)	(SEQ ID 528)

Ab	LC V-region	HC V-region
CH19_0-G9xl2C6	(SEQ ID 542)	(SEQ ID 540)
	(SEQ ID 543)	(SEQ ID 541)
CH19_1-E11xl2C6	(SEQ ID 555)	(SEQ ID 553)
	(SEQ ID 556)	(SEQ ID 554)
CH19_0-F5xl2C6	(SEQ ID 568)	(SEQ ID 566)
	(SEQ ID 569)	(SEQ ID 567)
CH19_1-E1xl2C6	(SEQ ID 581)	(SEQ ID 579)
	(SEQ ID 582)	(SEQ ID 580)
CH19_1-E6xl2C6	(SEQ ID 594)	(SEQ ID 592)
	(SEQ ID 595)	(SEQ ID 593)
CH19_2G6_302xl2C6	(SEQ ID 607)	(SEQ ID 605)
	(SEQ ID 608)	(SEQ ID 606)

Ab	VH - VL
CH19_2G6_302_VKG x12C6	(SEQ ID 11)
	(SEQ ID 12)
CH19_0-E11x12C6	(SEQ ID 24)
	(SEQ ID 25)
CH19_5-G4x12C6	(SEQ ID 37)
	(SEQ ID 38)
CH19_8-H6x12C6	(SEQ ID 50)
	(SEQ ID 51)
CH19_2-C11x12C6	(SEQ ID 63)
	(SEQ ID 64)
CH19_2-A10x12C6	(SEQ ID 76)
	(SEQ ID 77)
CH19_1-D11 x12C6	(SEQ ID 89)
	(SEQ ID 90)
CH19_9-F9x12C6	(SEQ ID 102)
	(SEQ ID 103)
CH19_1-H8x12C6	(SEQ ID 115)
	(SEQ ID 116)
CH19_1-B12x12C6	(SEQ ID 128)
	(SEQ ID 129)
CH19_0-C4x12C6	(SEQ ID 141)
	(SEQ ID 142)
CH19_3-F2x12C6	(SEQ ID 154)
	(SEQ ID 155)
CH19_3-B10x12C6	(SEQ ID 167)
	(SEQ ID 168)

Ab	VH - VL
CH19_8-F6x12C6	(SEQ ID 531)
	(SEQ ID 532)
CH19_0-G9x12C6	(SEQ ID 544)
	(SEQ ID 545)
CH19_1-E11x12C6	(SEQ ID 557)
	(SEQ ID 558)
CH19_0-F5x12C6	(SEQ ID 570)
	(SEQ ID 571)
CH19_1-E1x12C6	(SEQ ID 583)
	(SEQ ID 584)
CH19_1-E6x12C6	(SEQ ID 596)
	(SEQ ID 597)
CH19_2G6_302x12C6	(SEQ ID 609)
	(SEQ ID 610)

Ab	CDH19 x CD3
CH19_2G6_302_V KGx12C6	(SEQ ID 13)
CH19_0-E11x12C6	(SEQ ID 26)
CH19_5-G4x12C6	(SEQ ID 39)
CH19_8-H6x12C6	(SEQ ID 52)
CH19_2-C11x12C6	(SEQ ID 65)
CH19_2-A10x12C6	(SEQ ID 78)

Ab	VH - VL
CH19_0-G4x12C6	(SEQ ID 180)
	(SEQ ID 181)
CH19_0-H5x12C6	(SEQ ID 193)
	(SEQ ID 194)
CH19_0-B8x12C6	(SEQ ID 206)
	(SEQ ID 207)
CH19_2-D9x12C6	(SEQ ID 219)
	(SEQ ID 220)
CH19_8-H7x12C6	(SEQ ID 232)
	(SEQ ID 233)
CH19_9-C2x12C6	(SEQ ID 245)
	(SEQ ID 246)
CH19_3-D5x12C6	(SEQ ID 258)
	(SEQ ID 259)
CH19_1-G11x12C6	(SEQ ID 271)
	(SEQ ID 272)
CH19_1-H11x12C6	(SEQ ID 284)
	(SEQ ID 285)
CH19_9-F3x12C6	(SEQ ID 297)
	(SEQ ID 298)
CH19_2-G6x12C6	(SEQ ID 310)
	(SEQ ID 311)
CH19_2-H7x12C6	(SEQ ID 323)
	(SEQ ID 324)
CH19_5-B3x12C6	(SEQ ID 336)
	(SEQ ID 337)
CH19_5-	(SEQ ID 349)

CH19_1-D11 x12C6	(SEQ ID 91)
CH19_9-F9x12C6	(SEQ ID 104)
CH19_1-H8x12C6	(SEQ ID 117)
CH19_1-B12x12C6	(SEQ ID 130)
CH19_0-C4x12C6	(SEQ ID 143)
CH19_3-F2x12C6	(SEQ ID 156)
CH19_3-B10x12C6	(SEQ ID 169)
CH19_0-G4x12C6	(SEQ ID 182)
CH19_0-H5x12C6	(SEQ ID 195)
CH19_0-B8x12C6	(SEQ ID 208)
CH19_2-D9x12C6	(SEQ ID 221)
CH19_8-H7x12C6	(SEQ ID 234)
CH19_9-C2x12C6	(SEQ ID 247)
CH19_3-D5x12C6	(SEQ ID 260)
CH19_1-G11x12C6	(SEQ ID 273)

Ab	VH - VL
E10x12C6	(SEQ ID 350)
CH19_6-G10x12C6	(SEQ ID 362)
CH19_4-H8x12C6	(SEQ ID 375)
CH19_2-E4x12C6	(SEQ ID 388)
CH19_6-B8x12C6	(SEQ ID 401)
CH19_0-B4x12C6	(SEQ ID 414)
CH19_9-F1x12C6	(SEQ ID 427)
CH19_4-A7x12C6	(SEQ ID 440)
CH19_6-E12x12C6	(SEQ ID 453)
CH19_6-C12x12C6	(SEQ ID 466)
CH19_6-A7x12C6	(SEQ ID 479)
CH19_6-G8x12C6	(SEQ ID 492)
CH19_6-F9x12C6	(SEQ ID 505)
CH19_0-C11x12C6	(SEQ ID 518)
	(SEQ ID 519)

CH19_1-H11x12C6	(SEQ ID 286)
CH19_9-F3x12C6	(SEQ ID 299)
CH19_2-G6x12C6	(SEQ ID 312)
CH19_2-H7x12C6	(SEQ ID 325)
CH19_5-B3x12C6	(SEQ ID 338)
CH19_5-E10x12C6	(SEQ ID 351)
CH19_6-G10x12C6	(SEQ ID 364)
CH19_4-H8x12C6	(SEQ ID 377)
CH19_2-E4x12C6	(SEQ ID 390)
CH19_6-B8x12C6	(SEQ ID 403)
CH19_0-B4x12C6	(SEQ ID 416)
CH19_9-F1x12C6	(SEQ ID 429)
CH19_4-A7x12C6	(SEQ ID 442)
CH19_6-E12x12C6	(SEQ ID 455)
CH19_6-C12x12C6	(SEQ ID 468)
CH19_6-A7x12C6	(SEQ ID 481)

CH19_6- G8xI2C6	(SEQ ID 494)
CH19_6- F9xI2C6	(SEQ ID 507)
CH19_0- C11xI2C6	(SEQ ID 520)
CH19_8- F6xI2C6	(SEQ ID 533)
CH19_0- G9xI2C6	(SEQ ID 546)
CH19_1- E11xI2C6	(SEQ ID 559)
CH19_0- F5xI2C6	(SEQ ID 572)
CH19_1- E1xI2C6	(SEQ ID 585)
CH19_1- E6xI2C6	(SEQ ID 598)
CH19_2G 6_302xI2 C6	(SEQ ID 611)

SEQ ID	Designation
1.	CH19_2G6_3 02_VKGxI2C6- 156
2.	CH19_0- E11xI2C6-156
3.	CH19_5- G4xI2C6-156
4.	CH19_8- H6xI2C6-156
5.	CH19_2- C11xI2C6-156
6.	CH19_2- A10xI2C6-156
7.	CH19_1- D11xI2C6-156
8.	CH19_9- F9xI2C6-156
9.	CH19_1- H8xI2C6-156
10.	CH19_1- B12xI2C6-156
11.	CH19_0- C4xI2C6-156
12.	CH19_3- F2xI2C6-156
13.	CH19_3- B10xI2C6-156
14.	CH19_0- G4xI2C6-156
15.	CH19_0- H5xI2C6-156
16.	CH19_0- B8xI2C6-156

17.	CH19_2- D9xI2C6-156
18.	CH19_8- H7xI2C6-156
19.	CH19_9- C2xI2C6-156
20.	CH19_3- D5xI2C6-156
21.	CH19_1- G11xI2C6-156
22.	CH19_1- H11xI2C6-156
23.	CH19_9- F3xI2C6-156
24.	CH19_2- G6xI2C6-156
25.	CH19_2- H7xI2C6-156
26.	CH19_5- B3xI2C6-156
27.	CH19_5- E10xI2C6-156
28.	CH19_6- G10xI2C6-156
29.	CH19_4- H8xI2C6-156
30.	CH19_2- E4xI2C6-156
31.	CH19_6- B8xI2C6-156
32.	CH19_0- B4xI2C6-156
33.	CH19_9- F1xI2C6-156

34.	CH19_4- A7xI2C6-156
35.	CH19_6- E12xI2C6-156
36.	CH19_6- C12xI2C6-156
37.	CH19_6- A7xI2C6-156
38.	CH19_6- G8xI2C6-156
39.	CH19_6- F9xI2C6-156
40.	CH19_0- C11xI2C6-156
41.	CH19_8- F6xI2C6-156
42.	CH19_0- G9xI2C6-156
43.	CH19_1- E11xI2C6-156
44.	CH19_0- F5xI2C6-156
45.	CH19_1- E1xI2C6-156
46.	CH19_1- E6xI2C6-156
47.	CH19_2G6_3 02xI2C6-156
48.	CH19_2G6_3 02_VKGxI2C6- LFCBY
49.	CH19_0- E11xI2C6- LFCBY

50.	CH19_5- G4xI2C6- LFCBY
51.	CH19_8- H6xI2C6- LFCBY
52.	CH19_2- C11xI2C6- LFCBY
53.	CH19_2- A10xI2C6- LFCBY
54.	CH19_1- D11xI2C6- LFCBY
55.	CH19_9- F9xI2C6- LFCBY
56.	CH19_1- H8xI2C6- LFCBY
57.	CH19_1- B12xI2C6- LFCBY
58.	CH19_0- C4xI2C6- LFCBY
59.	CH19_3- F2xI2C6- LFCBY
60.	CH19_3- B10xI2C6- LFCBY
61.	CH19_0-

ES 2 973 788 T3

	G4xI2C6-LFcBY
62.	CH19_0-H5xI2C6-LFcBY
63.	CH19_0-B8xI2C6-LFcBY
64.	CH19_2-D9xI2C6-LFcBY
65.	CH19_8-H7xI2C6-LFcBY
66.	CH19_9-C2xI2C6-LFcBY
67.	CH19_3-D5xI2C6-LFcBY
68.	CH19_1-G11xI2C6-LFcBY
69.	CH19_1-H11xI2C6-LFcBY
70.	CH19_9-F3xI2C6-LFcBY
71.	CH19_2-G6xI2C6-LFcBY
72.	CH19_2-H7xI2C6-

	LFcBY
73.	CH19_5-B3xI2C6-LFcBY
74.	CH19_5-E10xI2C6-LFcBY
75.	CH19_6-G10xI2C6-LFcBY
76.	CH19_4-H8xI2C6-LFcBY
77.	CH19_2-E4xI2C6-LFcBY
78.	CH19_6-B8xI2C6-LFcBY
79.	CH19_0-B4xI2C6-LFcBY
80.	CH19_9-F1xI2C6-LFcBY
81.	CH19_4-A7xI2C6-LFcBY
82.	CH19_6-E12xI2C6-LFcBY
83.	CH19_6-C12xI2C6-LFcBY

84.	CH19_6-A7xI2C6-LFcBY
85.	CH19_6-G8xI2C6-LFcBY
86.	CH19_6-F9xI2C6-LFcBY
87.	CH19_0-C11xI2C6-LFcBY
88.	CH19_8-F6xI2C6-LFcBY
89.	CH19_0-G9xI2C6-LFcBY
90.	CH19_1-E11xI2C6-LFcBY
91.	CH19_0-F5xI2C6-LFcBY
92.	CH19_1-E1xI2C6-LFcBY
93.	CH19_1-E5xI2C6-LFcBY
94.	CH19_2G6_3-02xI2C6-LFcBY
95.	CH19_2G6_3-

	02_VKGxI2C6-LFcBY-156
96.	CH19_0-E11xI2C6-LFcBY-156
97.	CH19_5-G4xI2C6-LFcBY-156
98.	CH19_8-H6xI2C6-LFcBY-156
99.	CH19_2-C11xI2C6-LFcBY-156
100.	CH19_2-A10xI2C6-LFcBY-156
101.	CH19_1-D11xI2C6-LFcBY-156
102.	CH19_9-F9xI2C6-LFcBY-156
103.	CH19_1-H8xI2C6-LFcBY-156
104.	CH19_1-B12xI2C6-LFcBY-156
105.	CH19_0-C4xI2C6-LFcBY-156
106.	CH19_3-F2xI2C6-

	LFcBY-156
107.	CH19_3-B10xI2C6-LFcBY-156
108.	CH19_0-G4xI2C6-LFcBY-156
109.	CH19_0-H5xI2C6-LFcBY-156
110.	CH19_0-B8xI2C6-LFcBY-156
111.	CH19_2-D9xI2C6-LFcBY-156
112.	CH19_8-H7xI2C6-LFcBY-156
113.	CH19_9-C2xI2C6-LFcBY-156
114.	CH19_3-D5xI2C6-LFcBY-156
115.	CH19_1-G11xI2C6-LFcBY-156
116.	CH19_1-H11xI2C6-LFcBY-156
117.	CH19_9-F3xI2C6-LFcBY-156

118.	CH19_2-G6xI2C6-LFcBY-156
119.	CH19_2-H7xI2C6-LFcBY-156
120.	CH19_5-B3xI2C6-LFcBY-156
121.	CH19_5-E10xI2C6-LFcBY-156
122.	CH19_6-G10xI2C6-LFcBY-156
123.	CH19_4-H8xI2C6-LFcBY-156
124.	CH19_2-E4xI2C6-LFcBY-156
125.	CH19_6-B8xI2C6-LFcBY-156
126.	CH19_0-B4xI2C6-LFcBY-156
127.	CH19_9-F1xI2C6-LFcBY-156
128.	CH19_4-A7xI2C6-LFcBY-156
129.	CH19_6-

	E12xI2C6-LFcBY-156
130.	CH19_6-C12xI2C6-LFcBY-156
131.	CH19_6-A7xI2C6-LFcBY-156
132.	CH19_6-G8xI2C6-LFcBY-156
133.	CH19_6-F9xI2C6-LFcBY-156
134.	CH19_0-C11xI2C6-LFcBY-156
135.	CH19_8-F6xI2C6-LFcBY-156
136.	CH19_0-G9xI2C6-LFcBY-156
137.	CH19_1-E11xI2C6-LFcBY-156
138.	CH19_0-F5xI2C6-LFcBY-156
139.	CH19_1-E1xI2C6-LFcBY-156
140.	CH19_1-E5xI2C6-

	LFcBY-156
141.	CH19_2G6_3-02xI2C6-LFcBY-156
142.	CH19_2G6_3-02_VKGxI2C6-Cys-Loop
143.	CH19_0-E11xI2C6-Cys-Loop
144.	CH19_5-G4xI2C6-Cys-Loop
145.	CH19_8-H6xI2C6-Cys-Loop
146.	CH19_2-C11xI2C6-Cys-Loop
147.	CH19_2-A10xI2C6-Cys-Loop
148.	CH19_1-D11xI2C6-Cys-Loop
149.	CH19_9-F9xI2C6-Cys-Loop
150.	CH19_1-H8xI2C6-Cys-Loop
151.	CH19_1-B12xI2C6-Cys-Loop

ES 2 973 788 T3

152.	CH19_0- C4xI2C6-Cys- Loop
153.	CH19_3- F2xI2C6-Cys- Loop
154.	CH19_3- B10xI2C6-Cys- Loop
155.	CH19_0- G4xI2C6-Cys- Loop
156.	CH19_0- H5xI2C6-Cys- Loop
157.	CH19_0- B8xI2C6-Cys- Loop
158.	CH19_2- D9xI2C6-Cys- Loop
159.	CH19_8- H7xI2C6-Cys- Loop
160.	CH19_9- C2xI2C6-Cys- Loop
161.	CH19_3- D5xI2C6-Cys- Loop
162.	CH19_1- G11xI2C6- Cys-Loop
163.	CH19_1-

	H11xI2C6- Cys-Loop
164.	CH19_9- F3xI2C6-Cys- Loop
165.	CH19_2- G6xI2C6-Cys- Loop
166.	CH19_2- H7xI2C6-Cys- Loop
167.	CH19_5- B3xI2C6-Cys- Loop
168.	CH19_5- E10xI2C6-Cys- Loop
169.	CH19_6- G10xI2C6- Cys-Loop
170.	CH19_4- H8xI2C6-Cys- Loop
171.	CH19_2- E4xI2C6-Cys- Loop
172.	CH19_6- B8xI2C6-Cys- Loop
173.	CH19_0- B4xI2C6-Cys- Loop
174.	CH19_9- F1xI2C6-Cys-

	Loop
175.	CH19_4- A7xI2C6-Cys- Loop
176.	CH19_6- E12xI2C6-Cys- Loop
177.	CH19_6- C12xI2C6-Cys- Loop
178.	CH19_6- A7xI2C6-Cys- Loop
179.	CH19_6- G8xI2C6-Cys- Loop
180.	CH19_6- F9xI2C6-Cys- Loop
181.	CH19_0- C11xI2C6-Cys- Loop
182.	CH19_8- F6xI2C6-Cys- Loop
183.	CH19_0- G9xI2C6-Cys- Loop
184.	CH19_1- E11xI2C6-Cys- Loop
185.	CH19_0- F5xI2C6-Cys- Loop

186.	CH19_1- E1xI2C6-Cys- Loop
187.	CH19_1- E6xI2C6-Cys- Loop
188.	CH19_2G6_3 O2xI2C6-Cys- Loop
189.	CH19_2G6_3 O2_VKGxI2C6- LH-FcB-CH
190.	CH19_0- E11xI2C6-LH- FcB-CH
191.	CH19_5- G4xI2C6-LH- FcB-CH
192.	CH19_8- H6xI2C6-LH- FcB-CH
193.	CH19_2- C11xI2C6-LH- FcB-CH
194.	CH19_2- A10xI2C6-LH- FcB-CH
195.	CH19_1- D11xI2C6-LH- FcB-CH
196.	CH19_9- F9xI2C6-LH- FcB-CH
197.	CH19_1-

	H8xI2C6-LH- FcB-CH
198.	CH19_1- B12xI2C6-LH- FcB-CH
199.	CH19_0- C4xI2C6-LH- FcB-CH
200.	CH19_3- F2xI2C6-LH- FcB-CH
201.	CH19_3- B10xI2C6-LH- FcB-CH
202.	CH19_0- G4xI2C6-LH- FcB-CH
203.	CH19_0- H5xI2C6-LH- FcB-CH
204.	CH19_0- B8xI2C6-LH- FcB-CH
205.	CH19_2- D9xI2C6-LH- FcB-CH
206.	CH19_8- H7xI2C6-LH- FcB-CH
207.	CH19_9- C2xI2C6-LH- FcB-CH
208.	CH19_3- D5xI2C6-LH-

	FcB-CH
209.	CH19_1- G11xI2C6-LH- FcB-CH
210.	CH19_1- H11xI2C6-LH- FcB-CH
211.	CH19_9- F3xI2C6-LH- FcB-CH
212.	CH19_2- G6xI2C6-LH- FcB-CH
213.	CH19_2- H7xI2C6-LH- FcB-CH
214.	CH19_5- B3xI2C6-LH- FcB-CH
215.	CH19_5- E10xI2C6-LH- FcB-CH
216.	CH19_6- G10xI2C6-LH- FcB-CH
217.	CH19_4- H8xI2C6-LH- FcB-CH
218.	CH19_2- E4xI2C6-LH- FcB-CH
219.	CH19_6- B8xI2C6-LH- FcB-CH

220.	CH19_0- B4xI2C6-LH- FcB-CH
221.	CH19_9- F1xI2C6-LH- FcB-CH
222.	CH19_4- A7xI2C6-LH- FcB-CH
223.	CH19_6- E12xI2C6-LH- FcB-CH
224.	CH19_6- C12xI2C6-LH- FcB-CH
225.	CH19_6- A7xI2C6-LH- FcB-CH
226.	CH19_6- G8xI2C6-LH- FcB-CH
227.	CH19_6- F9xI2C6-LH- FcB-CH
228.	CH19_0- C11xI2C6-LH- FcB-CH
229.	CH19_8- F6xI2C6-LH- FcB-CH
230.	CH19_0- G9xI2C6-LH- FcB-CH
231.	CH19_1-

	E11xI2C6-LH- FcB-CH
232.	CH19_0- F5xI2C6-LH- FcB-CH
233.	CH19_1- E1xI2C6-LH- FcB-CH
234.	CH19_1- E6xI2C6-LH- FcB-CH
235.	CH19_2G6_3 O2xI2C6-LH- FcB-CH
236.	CH19_2G6_3 O2_VKGxI2C6- LH-FcB-LH
237.	CH19_0- E11xI2C6-LH- FcB-LH
238.	CH19_5- G4xI2C6-LH- FcB-LH
239.	CH19_8- H6xI2C6-LH- FcB-LH
240.	CH19_2- C11xI2C6-LH- FcB-LH
241.	CH19_2- A10xI2C6-LH- FcB-LH
242.	CH19_1- D11xI2C6-LH-

ES 2 973 788 T3

	FcB-LH
243.	CH19_9- F9xI2C6-LH- FcB-LH
244.	CH19_1- H8xI2C6-LH- FcB-LH
245.	CH19_1- B12xI2C6-LH- FcB-LH
246.	CH19_0- C4xI2C6-LH- FcB-LH
247.	CH19_3- F2xI2C6-LH- FcB-LH
248.	CH19_3- B10xI2C6-LH- FcB-LH
249.	CH19_0- G4xI2C6-LH- FcB-LH
250.	CH19_0- H5xI2C6-LH- FcB-LH
251.	CH19_0- B8xI2C6-LH- FcB-LH
252.	CH19_2- D9xI2C6-LH- FcB-LH
253.	CH19_8- H7xI2C6-LH- FcB-LH

254.	CH19_9- C2xI2C6-LH- FcB-LH
255.	CH19_3- D5xI2C6-LH- FcB-LH
256.	CH19_1- G11xI2C6-LH- FcB-LH
257.	CH19_1- H11xI2C6-LH- FcB-LH
258.	CH19_9- F3xI2C6-LH- FcB-LH
259.	CH19_2- G6xI2C6-LH- FcB-LH
260.	CH19_2- H7xI2C6-LH- FcB-LH
261.	CH19_5- B3xI2C6-LH- FcB-LH
262.	CH19_5- E10xI2C6-LH- FcB-LH
263.	CH19_6- G10xI2C6-LH- FcB-LH
264.	CH19_4- H8xI2C6-LH- FcB-LH
265.	CH19_2-

	E4xI2C6-LH- FcB-LH
266.	CH19_6- B8xI2C6-LH- FcB-LH
267.	CH19_0- B4xI2C6-LH- FcB-LH
268.	CH19_9- F1xI2C6-LH- FcB-LH
269.	CH19_4- A7xI2C6-LH- FcB-LH
270.	CH19_6- E12xI2C6-LH- FcB-LH
271.	CH19_6- C12xI2C6-LH- FcB-LH
272.	CH19_6- A7xI2C6-LH- FcB-LH
273.	CH19_6- G8xI2C6-LH- FcB-LH
274.	CH19_6- F9xI2C6-LH- FcB-LH
275.	CH19_0- C11xI2C6-LH- FcB-LH
276.	CH19_8- F6xI2C6-LH-

	FcB-LH
277.	CH19_0- G9xI2C6-LH- FcB-LH
278.	CH19_1- E11xI2C6-LH- FcB-LH
279.	CH19_0- F5xI2C6-LH- FcB-LH
280.	CH19_1- E1xI2C6-LH- FcB-LH
281.	CH19_1- E6xI2C6-LH- FcB-LH
282.	CH19_2G6_3 O2xI2C6-LH- FcB-LH
283.	CH19_2G6_3 O2_VKGxI2C6- LY-FcB-LH
284.	CH19_0- E11xI2C6-LY- FcB-LH
285.	CH19_5- G4xI2C6-LY- FcB-LH
286.	CH19_8- H6xI2C6-LY- FcB-LH
287.	CH19_2- C11xI2C6-LY- FcB-LH

288.	CH19_2- A10xI2C6-LY- FcB-LH
289.	CH19_1- D11xI2C6-LY- FcB-LH
290.	CH19_9- F9xI2C6-LY- FcB-LH
291.	CH19_1- H8xI2C6-LY- FcB-LH
292.	CH19_1- B12xI2C6-LY- FcB-LH
293.	CH19_0- C4xI2C6-LY- FcB-LH
294.	CH19_3- F2xI2C6-LY- FcB-LH
295.	CH19_3- B10xI2C6-LY- FcB-LH
296.	CH19_0- G4xI2C6-LY- FcB-LH
297.	CH19_0- H5xI2C6-LY- FcB-LH
298.	CH19_0- B8xI2C6-LY- FcB-LH
299.	CH19_2-

	D9xI2C6-LY- FcB-LH
300.	CH19_8- H7xI2C6-LY- FcB-LH
301.	CH19_9- C2xI2C6-LY- FcB-LH
302.	CH19_3- D5xI2C6-LY- FcB-LH
303.	CH19_1- G11xI2C6-LY- FcB-LH
304.	CH19_1- H11xI2C6-LY- FcB-LH
305.	CH19_9- F3xI2C6-LY- FcB-LH
306.	CH19_2- G6xI2C6-LY- FcB-LH
307.	CH19_2- H7xI2C6-LY- FcB-LH
308.	CH19_5- B3xI2C6-LY- FcB-LH
309.	CH19_5- E10xI2C6-LY- FcB-LH
310.	CH19_6- G10xI2C6-LY-

	FcB-LH
311.	CH19_4- H8xI2C6-LY- FcB-LH
312.	CH19_2- E4xI2C6-LY- FcB-LH
313.	CH19_6- B8xI2C6-LY- FcB-LH
314.	CH19_0- B4xI2C6-LY- FcB-LH
315.	CH19_9- F1xI2C6-LY- FcB-LH
316.	CH19_4- A7xI2C6-LY- FcB-LH
317.	CH19_6- E12xI2C6-LY- FcB-LH
318.	CH19_6- C12xI2C6-LY- FcB-LH
319.	CH19_6- A7xI2C6-LY- FcB-LH
320.	CH19_6- G8xI2C6-LY- FcB-LH
321.	CH19_6- F9xI2C6-LY- FcB-LH

322.	CH19_0- C11xI2C6-LY- FcB-LH
323.	CH19_8- F6xI2C6-LY- FcB-LH
324.	CH19_0- G9xI2C6-LY- FcB-LH
325.	CH19_1- E11xI2C6-LY- FcB-LH
326.	CH19_0- F5xI2C6-LY- FcB-LH
327.	CH19_1- E1xI2C6-LY- FcB-LH
328.	CH19_1- E6xI2C6-LY- FcB-LH
329.	CH19_2G6_3 O2xI2C6-LY- FcB-LH
330.	CH19_2G6_3 O2_VKGxI2C6- LH-FcB-CH- 156
331.	CH19_0- E11xI2C6-LH- FcB-CH-156
332.	CH19_5- G4xI2C6-LH- FcB-CH-156

ES 2 973 788 T3

333.	CH19_8- H6xI2C6-LH- FcB-CH-156		H5xI2C6-LH- FcB-CH-156		FcB-CH-156	367.	CH19_6- G8xI2C6-LH- FcB-CH-156
334.	CH19_2- C11xI2C6-LH- FcB-CH-156	345.	CH19_0- B8xI2C6-LH- FcB-CH-156	356.	CH19_5- E10xI2C6-LH- FcB-CH-156	368.	CH19_6- F9xI2C6-LH- FcB-CH-156
335.	CH19_2- A10xI2C6-LH- FcB-CH-156	346.	CH19_2- D9xI2C6-LH- FcB-CH-156	357.	CH19_6- G10xI2C6-LH- FcB-CH-156	369.	CH19_0- C11xI2C6-LH- FcB-CH-156
336.	CH19_1- D11xI2C6-LH- FcB-CH-156	347.	CH19_8- H7xI2C6-LH- FcB-CH-156	358.	CH19_4- H8xI2C6-LH- FcB-CH-156	370.	CH19_8- F6xI2C6-LH- FcB-CH-156
337.	CH19_9- F9xI2C6-LH- FcB-CH-156	348.	CH19_9- C2xI2C6-LH- FcB-CH-156	359.	CH19_2- E4xI2C6-LH- FcB-CH-156	371.	CH19_0- G9xI2C6-LH- FcB-CH-156
338.	CH19_1- H8xI2C6-LH- FcB-CH-156	349.	CH19_3- D5xI2C6-LH- FcB-CH-156	360.	CH19_6- B8xI2C6-LH- FcB-CH-156	372.	CH19_1- E11xI2C6-LH- FcB-CH-156
339.	CH19_1- B12xI2C6-LH- FcB-CH-156	350.	CH19_1- G11xI2C6-LH- FcB-CH-156	361.	CH19_0- B4xI2C6-LH- FcB-CH-156	373.	CH19_0- F5xI2C6-LH- FcB-CH-156
340.	CH19_0- C4xI2C6-LH- FcB-CH-156	351.	CH19_1- H11xI2C6-LH- FcB-CH-156	362.	CH19_9- F1xI2C6-LH- FcB-CH-156	374.	CH19_1- E1xI2C6-LH- FcB-CH-156
341.	CH19_3- F2xI2C6-LH- FcB-CH-156	352.	CH19_9- F3xI2C6-LH- FcB-CH-156	363.	CH19_4- A7xI2C6-LH- FcB-CH-156	375.	CH19_1- E6xI2C6-LH- FcB-CH-156
342.	CH19_3- B10xI2C6-LH- FcB-CH-156	353.	CH19_2- G6xI2C6-LH- FcB-CH-156	364.	CH19_6- E12xI2C6-LH- FcB-CH-156	376.	CH19_2G6_3 O2xI2C6-LH- FcB-CH-156
343.	CH19_0- G4xI2C6-LH- FcB-CH-156	354.	CH19_2- H7xI2C6-LH- FcB-CH-156	365.	CH19_6- C12xI2C6-LH- FcB-CH-156	377.	CH19_2G6_3 O2_VKGxI2C6- LH-FcB-LH- 156
344.	CH19_0-	355.	CH19_5- B3xI2C6-LH-	366.	CH19_6- A7xI2C6-LH- FcB-CH-156		
378.	CH19_0- E11xI2C6-LH- FcB-LH-156		B10xI2C6-LH- FcB-LH-156		FcB-LH-156	412.	CH19_6- C12xI2C6-LH- FcB-LH-156
379.	CH19_5- G4xI2C6-LH- FcB-LH-156	390.	CH19_0- G4xI2C6-LH- FcB-LH-156	401.	CH19_2- H7xI2C6-LH- FcB-LH-156	413.	CH19_6- A7xI2C6-LH- FcB-LH-156
380.	CH19_8- H6xI2C6-LH- FcB-LH-156	391.	CH19_0- H5xI2C6-LH- FcB-LH-156	402.	CH19_5- B3xI2C6-LH- FcB-LH-156	414.	CH19_6- G8xI2C6-LH- FcB-LH-156
381.	CH19_2- C11xI2C6-LH- FcB-LH-156	392.	CH19_0- B8xI2C6-LH- FcB-LH-156	403.	CH19_5- E10xI2C6-LH- FcB-LH-156	415.	CH19_6- F9xI2C6-LH- FcB-LH-156
382.	CH19_2- A10xI2C6-LH- FcB-LH-156	393.	CH19_2- D9xI2C6-LH- FcB-LH-156	404.	CH19_6- G10xI2C6-LH- FcB-LH-156	416.	CH19_0- C11xI2C6-LH- FcB-LH-156
383.	CH19_1- D11xI2C6-LH- FcB-LH-156	394.	CH19_8- H7xI2C6-LH- FcB-LH-156	405.	CH19_4- H8xI2C6-LH- FcB-LH-156	417.	CH19_8- F6xI2C6-LH- FcB-LH-156
384.	CH19_9- F9xI2C6-LH- FcB-LH-156	395.	CH19_9- C2xI2C6-LH- FcB-LH-156	406.	CH19_2- E4xI2C6-LH- FcB-LH-156	418.	CH19_0- G9xI2C6-LH- FcB-LH-156
385.	CH19_1- H8xI2C6-LH- FcB-LH-156	396.	CH19_3- D5xI2C6-LH- FcB-LH-156	407.	CH19_6- B8xI2C6-LH- FcB-LH-156	419.	CH19_1- E11xI2C6-LH- FcB-LH-156
386.	CH19_1- B12xI2C6-LH- FcB-LH-156	397.	CH19_1- G11xI2C6-LH- FcB-LH-156	408.	CH19_0- B4xI2C6-LH- FcB-LH-156	420.	CH19_0- F5xI2C6-LH- FcB-LH-156
387.	CH19_0- C4xI2C6-LH- FcB-LH-156	398.	CH19_1- H11xI2C6-LH- FcB-LH-156	409.	CH19_9- F1xI2C6-LH- FcB-LH-156	421.	CH19_1- E1xI2C6-LH- FcB-LH-156
388.	CH19_3- F2xI2C6-LH- FcB-LH-156	399.	CH19_9- F3xI2C6-LH- FcB-LH-156	410.	CH19_4- A7xI2C6-LH- FcB-LH-156	422.	CH19_1- E6xI2C6-LH- FcB-LH-156
389.	CH19_3-	400.	CH19_2- G6xI2C6-LH-	411.	CH19_6- E12xI2C6-LH- FcB-LH-156	423.	CH19_2G6_3

ES 2 973 788 T3

	02xI2C6-LH-FcB-LH-156
424.	CH19_2G6_3 02_VKGxI2C6-LY-FcB-LH-156
425.	CH19_0- E11xI2C6-LY-FcB-LH-156
426.	CH19_5- G4xI2C6-LY-FcB-LH-156
427.	CH19_8- H6xI2C6-LY-FcB-LH-156
428.	CH19_2- C11xI2C6-LY-FcB-LH-156
429.	CH19_2- A10xI2C6-LY-FcB-LH-156
430.	CH19_1- D11xI2C6-LY-FcB-LH-156
431.	CH19_9- F9xI2C6-LY-FcB-LH-156
432.	CH19_1- H8xI2C6-LY-FcB-LH-156
433.	CH19_1- B12xI2C6-LY-FcB-LH-156
434.	CH19_0-

	C4xI2C6-LY-FcB-LH-156
435.	CH19_3- F2xI2C6-LY-FcB-LH-156
436.	CH19_3- B10xI2C6-LY-FcB-LH-156
437.	CH19_0- G4xI2C6-LY-FcB-LH-156
438.	CH19_0- H5xI2C6-LY-FcB-LH-156
439.	CH19_0- B8xI2C6-LY-FcB-LH-156
440.	CH19_2- D9xI2C6-LY-FcB-LH-156
441.	CH19_8- H7xI2C6-LY-FcB-LH-156
442.	CH19_9- C2xI2C6-LY-FcB-LH-156
443.	CH19_3- D5xI2C6-LY-FcB-LH-156
444.	CH19_1- G11xI2C6-LY-FcB-LH-156
445.	CH19_1- H11xI2C6-LY-

	FcB-LH-156
446.	CH19_9- F3xI2C6-LY-FcB-LH-156
447.	CH19_2- G6xI2C6-LY-FcB-LH-156
448.	CH19_2- H7xI2C6-LY-FcB-LH-156
449.	CH19_5- B3xI2C6-LY-FcB-LH-156
450.	CH19_5- E10xI2C6-LY-FcB-LH-156
451.	CH19_6- G10xI2C6-LY-FcB-LH-156
452.	CH19_4- H8xI2C6-LY-FcB-LH-156
453.	CH19_2- E4xI2C6-LY-FcB-LH-156
454.	CH19_6- B8xI2C6-LY-FcB-LH-156
455.	CH19_0- B4xI2C6-LY-FcB-LH-156
456.	CH19_9- F1xI2C6-LY-FcB-LH-156

457.	CH19_4- A7xI2C6-LY-FcB-LH-156
458.	CH19_6- E12xI2C6-LY-FcB-LH-156
459.	CH19_6- C12xI2C6-LY-FcB-LH-156
460.	CH19_6- A7xI2C6-LY-FcB-LH-156
461.	CH19_6- G8xI2C6-LY-FcB-LH-156
462.	CH19_6- F9xI2C6-LY-FcB-LH-156
463.	CH19_0- C11xI2C6-LY-FcB-LH-156
464.	CH19_8- F6xI2C6-LY-FcB-LH-156
465.	CH19_0- G9xI2C6-LY-FcB-LH-156
466.	CH19_1- E11xI2C6-LY-FcB-LH-156
467.	CH19_0- F5xI2C6-LY-FcB-LH-156
468.	CH19_1-

	E1xI2C6-LY-FcB-LH-156
469.	CH19_1- E6xI2C6-LY-FcB-LH-156
470.	CH19_2G6_3 02xI2C6-LY-FcB-LH-156
471.	CH19_2G6_3 02_VKGxI2C6-ALB8
472.	CH19_0- E11xI2C6-ALB8
473.	CH19_5- G4xI2C6-ALB8
474.	CH19_8- H6xI2C6-ALB8
475.	CH19_2- C11xI2C6-ALB8
476.	CH19_2- A10xI2C6-ALB8
477.	CH19_1- D11xI2C6-ALB8
478.	CH19_9- F9xI2C6-ALB8
479.	CH19_1- H8xI2C6-ALB8
480.	CH19_1- B12xI2C6-ALB8

481.	CH19_0- C4xI2C6-ALB8
482.	CH19_3- F2xI2C6-ALB8
483.	CH19_3- B10xI2C6-ALB8
484.	CH19_0- G4xI2C6-ALB8
485.	CH19_0- H5xI2C6-ALB8
486.	CH19_0- B8xI2C6-ALB8
487.	CH19_2- D9xI2C6-ALB8
488.	CH19_8- H7xI2C6-ALB8
489.	CH19_9- C2xI2C6-ALB8
490.	CH19_3- D5xI2C6-ALB8
491.	CH19_1- G11xI2C6-ALB8
492.	CH19_1- H11xI2C6-ALB8
493.	CH19_9- F3xI2C6-ALB8
494.	CH19_2- G6xI2C6-ALB8
495.	CH19_2- H7xI2C6-ALB8
496.	CH19_5-

	B3xI2C6-ALB8
497.	CH19_5- E10xI2C6-ALB8
498.	CH19_6- G10xI2C6-ALB8
499.	CH19_4- H8xI2C6-ALB8
500.	CH19_2- E4xI2C6-ALB8
501.	CH19_6- B8xI2C6-ALB8
502.	CH19_0- B4xI2C6-ALB8
503.	CH19_9- F1xI2C6-ALB8
504.	CH19_4- A7xI2C6-ALB8
505.	CH19_6- E12xI2C6-ALB8
506.	CH19_6- C12xI2C6-ALB8
507.	CH19_6- A7xI2C6-ALB8
508.	CH19_6- G8xI2C6-ALB8
509.	CH19_6- F9xI2C6-ALB8
510.	CH19_0- C11xI2C6-ALB8

511.	CH19_8- F6xI2C6-ALB8
512.	CH19_0- G9xI2C6-ALB8
513.	CH19_1- E11xI2C6-ALB8
514.	CH19_0- F5xI2C6-ALB8
515.	CH19_1- E1xI2C6-ALB8
516.	CH19_1- E6xI2C6-ALB8
517.	CH19_2G6_3 02xI2C6-ALB8
518.	CH19_2G6_3 02_VKGxI2C6-ALB23
519.	CH19_0- E11xI2C6-ALB23
520.	CH19_5- G4xI2C6-ALB23
521.	CH19_8- H6xI2C6-ALB23
522.	CH19_2- C11xI2C6-ALB23
523.	CH19_2- A10xI2C6-ALB23
524.	CH19_1-

ES 2 973 788 T3

	D11xI2C6-ALB23
525.	CH19_9-F9xI2C6-ALB23
526.	CH19_1-H8xI2C6-ALB23
527.	CH19_1-B12xI2C6-ALB23
528.	CH19_0-C4xI2C6-ALB23
529.	CH19_3-F2xI2C6-ALB23
530.	CH19_3-B10xI2C6-ALB23
531.	CH19_0-G4xI2C6-ALB23
532.	CH19_0-H5xI2C6-ALB23
533.	CH19_0-B8xI2C6-ALB23
534.	CH19_2-D9xI2C6-ALB23
535.	CH19_8-H7xI2C6-

	ALB23
536.	CH19_9-C2xI2C6-ALB23
537.	CH19_3-D5xI2C6-ALB23
538.	CH19_1-G11xI2C6-ALB23
539.	CH19_1-H11xI2C6-ALB23
540.	CH19_9-F3xI2C6-ALB23
541.	CH19_2-G6xI2C6-ALB23
542.	CH19_2-H7xI2C6-ALB23
543.	CH19_5-B3xI2C6-ALB23
544.	CH19_5-E10xI2C6-ALB23
545.	CH19_6-G10xI2C6-ALB23
546.	CH19_4-H8xI2C6-ALB23

547.	CH19_2-E4xI2C6-ALB23
548.	CH19_6-B8xI2C6-ALB23
549.	CH19_0-B4xI2C6-ALB23
550.	CH19_9-F1xI2C6-ALB23
551.	CH19_4-A7xI2C6-ALB23
552.	CH19_6-E12xI2C6-ALB23
553.	CH19_6-C12xI2C6-ALB23
554.	CH19_6-A7xI2C6-ALB23
555.	CH19_6-G8xI2C6-ALB23
556.	CH19_6-F9xI2C6-ALB23
557.	CH19_0-C11xI2C6-ALB23
558.	CH19_8-

	F6xI2C6-ALB23
559.	CH19_0-G9xI2C6-ALB23
560.	CH19_1-E11xI2C6-ALB23
561.	CH19_0-F5xI2C6-ALB23
562.	CH19_1-E1xI2C6-ALB23
563.	CH19_1-E6xI2C6-ALB23
564.	CH19_2G6_3O2xI2C6-ALB23
565.	CH19_2G6_3O2_VKGxI2C6-HALBwD
566.	CH19_0-E11xI2C6-HALBwD
567.	CH19_5-G4xI2C6-HALBwD
568.	CH19_8-H6xI2C6-HALBwD
569.	CH19_2-C11xI2C6-

	HALBwD
570.	CH19_2-A10xI2C6-HALBwD
571.	CH19_1-D11xI2C6-HALBwD
572.	CH19_9-F9xI2C6-HALBwD
573.	CH19_1-H8xI2C6-HALBwD
574.	CH19_1-B12xI2C6-HALBwD
575.	CH19_0-C4xI2C6-HALBwD
576.	CH19_3-F2xI2C6-HALBwD
577.	CH19_3-B10xI2C6-HALBwD
578.	CH19_0-G4xI2C6-HALBwD
579.	CH19_0-H5xI2C6-HALBwD
580.	CH19_0-B8xI2C6-HALBwD

581.	CH19_2-D9xI2C6-HALBwD
582.	CH19_8-H7xI2C6-HALBwD
583.	CH19_9-C2xI2C6-HALBwD
584.	CH19_3-D5xI2C6-HALBwD
585.	CH19_1-G11xI2C6-HALBwD
586.	CH19_1-H11xI2C6-HALBwD
587.	CH19_9-F3xI2C6-HALBwD
588.	CH19_2-G6xI2C6-HALBwD
589.	CH19_2-H7xI2C6-HALBwD
590.	CH19_5-B3xI2C6-HALBwD
591.	CH19_5-E10xI2C6-HALBwD
592.	CH19_6-

	G10xI2C6-HALBwD
593.	CH19_4-H8xI2C6-HALBwD
594.	CH19_2-E4xI2C6-HALBwD
595.	CH19_6-B8xI2C6-HALBwD
596.	CH19_0-B4xI2C6-HALBwD
597.	CH19_9-F1xI2C6-HALBwD
598.	CH19_4-A7xI2C6-HALBwD
599.	CH19_6-E12xI2C6-HALBwD
600.	CH19_6-C12xI2C6-HALBwD
601.	CH19_6-A7xI2C6-HALBwD
602.	CH19_6-G8xI2C6-HALBwD
603.	CH19_6-F9xI2C6-

	HALBwD
604.	CH19_0-C11xI2C6-HALBwD
605.	CH19_8-F6xI2C6-HALBwD
606.	CH19_0-G9xI2C6-HALBwD
607.	CH19_1-E11xI2C6-HALBwD
608.	CH19_0-F5xI2C6-HALBwD
609.	CH19_1-E1xI2C6-HALBwD
610.	CH19_1-E6xI2C6-HALBwD
611.	CH19_2G6_3O2xI2C6-HALBwD
612.	CH19_2G6_3O2_VKGxI2C6-HALB
613.	CH19_0-E11xI2C6-HALB
614.	CH19_5-G4xI2C6-HALB

ES 2 973 788 T3

615.	CH19_8-H6xI2C6-HALB
616.	CH19_2-C11xI2C6-HALB
617.	CH19_2-A10xI2C6-HALB
618.	CH19_1-D11xI2C6-HALB
619.	CH19_9-F9xI2C6-HALB
620.	CH19_1-H8xI2C6-HALB
621.	CH19_1-B12xI2C6-HALB
622.	CH19_0-C4xI2C6-HALB
623.	CH19_3-F2xI2C6-HALB
624.	CH19_3-B10xI2C6-HALB
625.	CH19_0-G4xI2C6-HALB
626.	CH19_0-H5xI2C6-HALB
627.	CH19_0-

	B8xI2C6-HALB
628.	CH19_2-D9xI2C6-HALB
629.	CH19_8-H7xI2C6-HALB
630.	CH19_9-C2xI2C6-HALB
631.	CH19_3-D5xI2C6-HALB
632.	CH19_1-G11xI2C6-HALB
633.	CH19_1-H11xI2C6-HALB
634.	CH19_9-F3xI2C6-HALB
635.	CH19_2-G6xI2C6-HALB
636.	CH19_2-H7xI2C6-HALB
637.	CH19_5-B3xI2C6-HALB
638.	CH19_5-E10xI2C6-HALB
639.	CH19_6-G10xI2C6-HALB

640.	CH19_4-H8xI2C6-HALB
641.	CH19_2-E4xI2C6-HALB
642.	CH19_6-B8xI2C6-HALB
643.	CH19_0-B4xI2C6-HALB
644.	CH19_9-F1xI2C6-HALB
645.	CH19_4-A7xI2C6-HALB
646.	CH19_6-E12xI2C6-HALB
647.	CH19_6-C12xI2C6-HALB
648.	CH19_6-A7xI2C6-HALB
649.	CH19_6-G8xI2C6-HALB
650.	CH19_6-F9xI2C6-HALB
651.	CH19_0-C11xI2C6-HALB
652.	CH19_8-F6xI2C6-HALB
653.	CH19_0-

	G9xI2C6-HALB
654.	CH19_1-E11xI2C6-HALB
655.	CH19_0-F5xI2C6-HALB
656.	CH19_1-E1xI2C6-HALB
657.	CH19_1-E6xI2C6-HALB
658.	CH19_2G6_3O2xI2C6-HALB
659.	CH19_2G6_3O2_VKGxI2C6-HALB7
660.	CH19_0-E11xI2C6-HALB7
661.	CH19_5-G4xI2C6-HALB7
662.	CH19_8-H6xI2C6-HALB7
663.	CH19_2-C11xI2C6-HALB7
664.	CH19_2-A10xI2C6-HALB7
665.	CH19_1-D11xI2C6-HALB7

666.	CH19_9-F9xI2C6-HALB7
667.	CH19_1-H8xI2C6-HALB7
668.	CH19_1-B12xI2C6-HALB7
669.	CH19_0-C4xI2C6-HALB7
670.	CH19_3-F2xI2C6-HALB7
671.	CH19_3-B10xI2C6-HALB7
672.	CH19_0-G4xI2C6-HALB7
673.	CH19_0-H5xI2C6-HALB7
674.	CH19_0-B8xI2C6-HALB7
675.	CH19_2-D9xI2C6-HALB7
676.	CH19_8-H7xI2C6-HALB7
677.	CH19_9-

	C2xI2C6-HALB7
678.	CH19_3-D5xI2C6-HALB7
679.	CH19_1-G11xI2C6-HALB7
680.	CH19_1-H11xI2C6-HALB7
681.	CH19_9-F3xI2C6-HALB7
682.	CH19_2-G6xI2C6-HALB7
683.	CH19_2-H7xI2C6-HALB7
684.	CH19_5-B3xI2C6-HALB7
685.	CH19_5-E10xI2C6-HALB7
686.	CH19_6-G10xI2C6-HALB7
687.	CH19_4-H8xI2C6-HALB7
688.	CH19_2-E4xI2C6-

	HALB7
689.	CH19_6-B8xI2C6-HALB7
690.	CH19_0-B4xI2C6-HALB7
691.	CH19_9-F1xI2C6-HALB7
692.	CH19_4-A7xI2C6-HALB7
693.	CH19_6-E12xI2C6-HALB7
694.	CH19_6-C12xI2C6-HALB7
695.	CH19_6-A7xI2C6-HALB7
696.	CH19_6-G8xI2C6-HALB7
697.	CH19_6-F9xI2C6-HALB7
698.	CH19_0-C11xI2C6-HALB7
699.	CH19_8-F6xI2C6-HALB7

700.	CH19_0-G9xI2C6-HALB7
701.	CH19_1-E11xI2C6-HALB7
702.	CH19_0-F5xI2C6-HALB7
703.	CH19_1-E1xI2C6-HALB7
704.	CH19_1-E6xI2C6-HALB7
705.	CH19_2G6_3O2xI2C6-HALB7
706.	CH19_2G6_3O2_VKGxI2C6-HALB098
707.	CH19_0-E11xI2C6-HALB098
708.	CH19_5-G4xI2C6-HALB098
709.	CH19_8-H6xI2C6-HALB098
710.	CH19_2-C11xI2C6-HALB098
711.	CH19_2-

ES 2 973 788 T3

	A10xI2C6-HALB098
712.	CH19_1-D11xI2C6-HALB098
713.	CH19_9-F9xI2C6-HALB098
714.	CH19_1-H8xI2C6-HALB098
715.	CH19_1-B12xI2C6-HALB098
716.	CH19_0-C4xI2C6-HALB098
717.	CH19_3-F2xI2C6-HALB098
718.	CH19_3-B10xI2C6-HALB098
719.	CH19_0-G4xI2C6-HALB098
720.	CH19_0-H5xI2C6-HALB098
721.	CH19_0-B8xI2C6-HALB098
722.	CH19_2-D9xI2C6-

	HALB098
723.	CH19_8-H7xI2C6-HALB098
724.	CH19_9-C2xI2C6-HALB098
725.	CH19_3-D5xI2C6-HALB098
726.	CH19_1-G11xI2C6-HALB098
727.	CH19_1-H11xI2C6-HALB098
728.	CH19_9-F3xI2C6-HALB098
729.	CH19_2-G6xI2C6-HALB098
730.	CH19_2-H7xI2C6-HALB098
731.	CH19_5-B3xI2C6-HALB098
732.	CH19_5-E10xI2C6-HALB098
733.	CH19_6-G10xI2C6-HALB098

734.	CH19_4-H8xI2C6-HALB098
735.	CH19_2-E4xI2C6-HALB098
736.	CH19_6-B8xI2C6-HALB098
737.	CH19_0-B4xI2C6-HALB098
738.	CH19_9-F1xI2C6-HALB098
739.	CH19_4-A7xI2C6-HALB098
740.	CH19_6-E12xI2C6-HALB098
741.	CH19_6-C12xI2C6-HALB098
742.	CH19_6-A7xI2C6-HALB098
743.	CH19_6-G8xI2C6-HALB098
744.	CH19_6-F9xI2C6-HALB098
745.	CH19_0-

	C11xI2C6-HALB098
746.	CH19_8-F6xI2C6-HALB098
747.	CH19_0-G9xI2C6-HALB098
748.	CH19_1-E11xI2C6-HALB098
749.	CH19_0-F5xI2C6-HALB098
750.	CH19_1-E1xI2C6-HALB098
751.	CH19_1-E6xI2C6-HALB098
752.	CH19_2G6_3 02xI2C6-HALB098
753.	CH19_2G6_3 02_VKGxI2C6-HALB114
754.	CH19_0-E11xI2C6-HALB114
755.	CH19_5-G4xI2C6-HALB114
756.	CH19_8-H6xI2C6-

	HALB114
757.	CH19_2-C11xI2C6-HALB114
758.	CH19_2-A10xI2C6-HALB114
759.	CH19_1-D11xI2C6-HALB114
760.	CH19_9-F9xI2C6-HALB114
761.	CH19_1-H8xI2C6-HALB114
762.	CH19_1-B12xI2C6-HALB114
763.	CH19_0-C4xI2C6-HALB114
764.	CH19_3-F2xI2C6-HALB114
765.	CH19_3-B10xI2C6-HALB114
766.	CH19_0-G4xI2C6-HALB114
767.	CH19_0-H5xI2C6-HALB114

768.	CH19_0-B8xI2C6-HALB114
769.	CH19_2-D9xI2C6-HALB114
770.	CH19_8-H7xI2C6-HALB114
771.	CH19_9-C2xI2C6-HALB114
772.	CH19_3-D5xI2C6-HALB114
773.	CH19_1-G11xI2C6-HALB114
774.	CH19_1-H11xI2C6-HALB114
775.	CH19_9-F3xI2C6-HALB114
776.	CH19_2-G6xI2C6-HALB114
777.	CH19_2-H7xI2C6-HALB114
778.	CH19_5-B3xI2C6-HALB114
779.	CH19_5-

	E10xI2C6-HALB114
780.	CH19_6-G10xI2C6-HALB114
781.	CH19_4-H8xI2C6-HALB114
782.	CH19_2-E4xI2C6-HALB114
783.	CH19_6-B8xI2C6-HALB114
784.	CH19_0-B4xI2C6-HALB114
785.	CH19_9-F1xI2C6-HALB114
786.	CH19_4-A7xI2C6-HALB114
787.	CH19_6-E12xI2C6-HALB114
788.	CH19_6-C12xI2C6-HALB114
789.	CH19_6-A7xI2C6-HALB114
790.	CH19_6-G8xI2C6-

	HALB114
791.	CH19_6-F9xI2C6-HALB114
792.	CH19_0-C11xI2C6-HALB114
793.	CH19_8-F6xI2C6-HALB114
794.	CH19_0-G9xI2C6-HALB114
795.	CH19_1-E11xI2C6-HALB114
796.	CH19_0-F5xI2C6-HALB114
797.	CH19_1-E1xI2C6-HALB114
798.	CH19_1-E6xI2C6-HALB114
799.	CH19_2G6_3 02xI2C6-HALB114
800.	CH19_2G6_3 02_VKGxI2C6-HALB254
801.	CH19_0-E11xI2C6-HALB254

ES 2 973 788 T3

802.	CH19_5- G4xI2C6- HALB254
803.	CH19_8- H6xI2C6- HALB254
804.	CH19_2- C11xI2C6- HALB254
805.	CH19_2- A10xI2C6- HALB254
806.	CH19_1- D11xI2C6- HALB254
807.	CH19_9- F9xI2C6- HALB254
808.	CH19_1- H8xI2C6- HALB254
809.	CH19_1- B12xI2C6- HALB254
810.	CH19_0- C4xI2C6- HALB254
811.	CH19_3- F2xI2C6- HALB254
812.	CH19_3- B10xI2C6- HALB254
813.	CH19_0-

	G4xI2C6- HALB254
814.	CH19_0- H5xI2C6- HALB254
815.	CH19_0- B8xI2C6- HALB254
816.	CH19_2- D9xI2C6- HALB254
817.	CH19_8- H7xI2C6- HALB254
818.	CH19_9- C2xI2C6- HALB254
819.	CH19_3- D5xI2C6- HALB254
820.	CH19_1- G11xI2C6- HALB254
821.	CH19_1- H11xI2C6- HALB254
822.	CH19_9- F3xI2C6- HALB254
823.	CH19_2- G6xI2C6- HALB254
824.	CH19_2- H7xI2C6-

	HALB254
825.	CH19_5- B3xI2C6- HALB254
826.	CH19_5- E10xI2C6- HALB254
827.	CH19_6- G10xI2C6- HALB254
828.	CH19_4- H8xI2C6- HALB254
829.	CH19_2- E4xI2C6- HALB254
830.	CH19_6- B8xI2C6- HALB254
831.	CH19_0- B4xI2C6- HALB254
832.	CH19_9- F1xI2C6- HALB254
833.	CH19_4- A7xI2C6- HALB254
834.	CH19_6- E12xI2C6- HALB254
835.	CH19_6- C12xI2C6- HALB254

836.	CH19_6- A7xI2C6- HALB254
837.	CH19_6- G8xI2C6- HALB254
838.	CH19_6- F9xI2C6- HALB254
839.	CH19_0- C11xI2C6- HALB254
840.	CH19_8- F6xI2C6- HALB254
841.	CH19_0- G9xI2C6- HALB254
842.	CH19_1- E11xI2C6- HALB254
843.	CH19_0- F5xI2C6- HALB254
844.	CH19_1- E1xI2C6- HALB254
845.	CH19_1- E6xI2C6- HALB254
846.	CH19_2G6_3 O2xI2C6- HALB254
847.	CH19_2G6_3

	O2_VKGxI2C6- CH-FcB-LH
848.	CH19_0- E11xI2C6-CH- FcB-LH
849.	CH19_5- G4xI2C6-CH- FcB-LH
850.	CH19_8- H6xI2C6-CH- FcB-LH
851.	CH19_2- C11xI2C6-CH- FcB-LH
852.	CH19_2- A10xI2C6-CH- FcB-LH
853.	CH19_1- D11xI2C6-CH- FcB-LH
854.	CH19_9- F9xI2C6-CH- FcB-LH
855.	CH19_1- H8xI2C6-CH- FcB-LH
856.	CH19_1- B12xI2C6-CH- FcB-LH
857.	CH19_0- C4xI2C6-CH- FcB-LH
858.	CH19_3- F2xI2C6-CH-

	FcB-LH
859.	CH19_3- B10xI2C6-CH- FcB-LH
860.	CH19_0- G4xI2C6-CH- FcB-LH
861.	CH19_0- H5xI2C6-CH- FcB-LH
862.	CH19_0- B8xI2C6-CH- FcB-LH
863.	CH19_2- D9xI2C6-CH- FcB-LH
864.	CH19_8- H7xI2C6-CH- FcB-LH
865.	CH19_9- C2xI2C6-CH- FcB-LH
866.	CH19_3- D5xI2C6-CH- FcB-LH
867.	CH19_1- G11xI2C6-CH- FcB-LH
868.	CH19_1- H11xI2C6-CH- FcB-LH
869.	CH19_9- F3xI2C6-CH- FcB-LH

870.	CH19_2- G6xI2C6-CH- FcB-LH
871.	CH19_2- H7xI2C6-CH- FcB-LH
872.	CH19_5- B3xI2C6-CH- FcB-LH
873.	CH19_5- E10xI2C6-CH- FcB-LH
874.	CH19_6- G10xI2C6-CH- FcB-LH
875.	CH19_4- H8xI2C6-CH- FcB-LH
876.	CH19_2- E4xI2C6-CH- FcB-LH
877.	CH19_6- B8xI2C6-CH- FcB-LH
878.	CH19_0- B4xI2C6-CH- FcB-LH
879.	CH19_9- F1xI2C6-CH- FcB-LH
880.	CH19_4- A7xI2C6-CH- FcB-LH
881.	CH19_6-

	E12xI2C6-CH- FcB-LH
882.	CH19_6- C12xI2C6-CH- FcB-LH
883.	CH19_6- A7xI2C6-CH- FcB-LH
884.	CH19_6- G8xI2C6-CH- FcB-LH
885.	CH19_6- F9xI2C6-CH- FcB-LH
886.	CH19_0- C11xI2C6-CH- FcB-LH
887.	CH19_8- F6xI2C6-CH- FcB-LH
888.	CH19_0- G9xI2C6-CH- FcB-LH
889.	CH19_1- E11xI2C6-CH- FcB-LH
890.	CH19_0- F5xI2C6-CH- FcB-LH
891.	CH19_1- E1xI2C6-CH- FcB-LH
892.	CH19_1- E6xI2C6-CH-

ES 2 973 788 T3

	FcB-LH
893.	CH19_2G6_3 02xI2C6-CH- FcB-LH
894.	CH19_2G6_3 02_VKGxI2C6- CH-FcB-LY
895.	CH19_0- E11xI2C6-CH- FcB-LY
896.	CH19_5- G4xI2C6-CH- FcB-LY
897.	CH19_8- H6xI2C6-CH- FcB-LY
898.	CH19_2- C11xI2C6-CH- FcB-LY
899.	CH19_2- A10xI2C6-CH- FcB-LY
900.	CH19_1- D11xI2C6-CH- FcB-LY
901.	CH19_9- F9xI2C6-CH- FcB-LY
902.	CH19_1- H8xI2C6-CH- FcB-LY
903.	CH19_1- B12xI2C6-CH- FcB-LY

904.	CH19_0- C4xI2C6-CH- FcB-LY
905.	CH19_3- F2xI2C6-CH- FcB-LY
906.	CH19_3- B10xI2C6-CH- FcB-LY
907.	CH19_0- G4xI2C6-CH- FcB-LY
908.	CH19_0- H5xI2C6-CH- FcB-LY
909.	CH19_0- B8xI2C6-CH- FcB-LY
910.	CH19_2- D9xI2C6-CH- FcB-LY
911.	CH19_8- H7xI2C6-CH- FcB-LY
912.	CH19_9- C2xI2C6-CH- FcB-LY
913.	CH19_3- D5xI2C6-CH- FcB-LY
914.	CH19_1- G11xI2C6-CH- FcB-LY
915.	CH19_1-

	H11xI2C6-CH- FcB-LY
916.	CH19_9- F3xI2C6-CH- FcB-LY
917.	CH19_2- G6xI2C6-CH- FcB-LY
918.	CH19_2- H7xI2C6-CH- FcB-LY
919.	CH19_5- B3xI2C6-CH- FcB-LY
920.	CH19_5- E10xI2C6-CH- FcB-LY
921.	CH19_6- G10xI2C6-CH- FcB-LY
922.	CH19_4- H8xI2C6-CH- FcB-LY
923.	CH19_2- E4xI2C6-CH- FcB-LY
924.	CH19_6- B8xI2C6-CH- FcB-LY
925.	CH19_0- B4xI2C6-CH- FcB-LY
926.	CH19_9- F1xI2C6-CH-

	FcB-LY
927.	CH19_4- A7xI2C6-CH- FcB-LY
928.	CH19_6- E12xI2C6-CH- FcB-LY
929.	CH19_6- C12xI2C6-CH- FcB-LY
930.	CH19_6- A7xI2C6-CH- FcB-LY
931.	CH19_6- G8xI2C6-CH- FcB-LY
932.	CH19_6- F9xI2C6-CH- FcB-LY
933.	CH19_0- C11xI2C6-CH- FcB-LY
934.	CH19_8- F6xI2C6-CH- FcB-LY
935.	CH19_0- G9xI2C6-CH- FcB-LY
936.	CH19_1- E11xI2C6-CH- FcB-LY
937.	CH19_0- F5xI2C6-CH- FcB-LY

938.	CH19_1- E1xI2C6-CH- FcB-LY
939.	CH19_1- E6xI2C6-CH- FcB-LY
940.	CH19_2G6_3 02xI2C6-CH- FcB-LY
941.	CH19_2G6_3 02_VKGxI2C6- HALB253
942.	CH19_0- E11xI2C6- HALB253
943.	CH19_5- G4xI2C6- HALB253
944.	CH19_8- H6xI2C6- HALB253
945.	CH19_2- C11xI2C6- HALB253
946.	CH19_2- A10xI2C6- HALB253
947.	CH19_1- D11xI2C6- HALB253
948.	CH19_9- F9xI2C6- HALB253
949.	CH19_1-

	H8xI2C6- HALB253
950.	CH19_1- B12xI2C6- HALB253
951.	CH19_0- C4xI2C6- HALB253
952.	CH19_3- F2xI2C6- HALB253
953.	CH19_3- B10xI2C6- HALB253
954.	CH19_0- G4xI2C6- HALB253
955.	CH19_0- H5xI2C6- HALB253
956.	CH19_0- B8xI2C6- HALB253
957.	CH19_2- D9xI2C6- HALB253
958.	CH19_8- H7xI2C6- HALB253
959.	CH19_9- C2xI2C6- HALB253
960.	CH19_3- D5xI2C6-

	HALB253
961.	CH19_1- G11xI2C6- HALB253
962.	CH19_1- H11xI2C6- HALB253
963.	CH19_9- F3xI2C6- HALB253
964.	CH19_2- G6xI2C6- HALB253
965.	CH19_2- H7xI2C6- HALB253
966.	CH19_5- B3xI2C6- HALB253
967.	CH19_5- E10xI2C6- HALB253
968.	CH19_6- G10xI2C6- HALB253
969.	CH19_4- H8xI2C6- HALB253
970.	CH19_2- E4xI2C6- HALB253
971.	CH19_6- B8xI2C6- HALB253

972.	CH19_0- B4xI2C6- HALB253
973.	CH19_9- F1xI2C6- HALB253
974.	CH19_4- A7xI2C6- HALB253
975.	CH19_6- E12xI2C6- HALB253
976.	CH19_6- C12xI2C6- HALB253
977.	CH19_6- A7xI2C6- HALB253
978.	CH19_6- G8xI2C6- HALB253
979.	CH19_6- F9xI2C6- HALB253
980.	CH19_0- C11xI2C6- HALB253
981.	CH19_8- F6xI2C6- HALB253
982.	CH19_0- G9xI2C6- HALB253
983.	CH19_1-

ES 2 973 788 T3

	E11xI2C6- HALB253
984.	CH19_0- F5xI2C6- HALB253
985.	CH19_1- E1xI2C6- HALB253
986.	CH19_1- E6xI2C6- HALB253
987.	CH19_2G6_3 02xI2C6- HALB253
988.	CH19_2G6_3 02_VKGxI2C6- HALB131
989.	CH19_0- E11xI2C6- HALB131
990.	CH19_5- G4xI2C6- HALB131
991.	CH19_8- H6xI2C6- HALB131
992.	CH19_2- C11xI2C6- HALB131
993.	CH19_2- A10xI2C6- HALB131
994.	CH19_1- D11xI2C6-

	HALB131
995.	CH19_9- F9xI2C6- HALB131
996.	CH19_1- H8xI2C6- HALB131
997.	CH19_1- B12xI2C6- HALB131
998.	CH19_0- C4xI2C6- HALB131
999.	CH19_3- F2xI2C6- HALB131
1000.	CH19_3- B10xI2C6- HALB131
1001.	CH19_0- G4xI2C6- HALB131
1002.	CH19_0- H5xI2C6- HALB131
1003.	CH19_0- B8xI2C6- HALB131
1004.	CH19_2- D9xI2C6- HALB131
1005.	CH19_8- H7xI2C6- HALB131

1006.	CH19_9- C2xI2C6- HALB131
1007.	CH19_3- D5xI2C6- HALB131
1008.	CH19_1- G11xI2C6- HALB131
1009.	CH19_1- H11xI2C6- HALB131
1010.	CH19_9- F3xI2C6- HALB131
1011.	CH19_2- G6xI2C6- HALB131
1012.	CH19_2- H7xI2C6- HALB131
1013.	CH19_5- B3xI2C6- HALB131
1014.	CH19_5- E10xI2C6- HALB131
1015.	CH19_6- G10xI2C6- HALB131
1016.	CH19_4- H8xI2C6- HALB131
1017.	CH19_2-

	E4xI2C6- HALB131
1018.	CH19_6- B8xI2C6- HALB131
1019.	CH19_0- B4xI2C6- HALB131
1020.	CH19_9- F1xI2C6- HALB131
1021.	CH19_4- A7xI2C6- HALB131
1022.	CH19_6- E12xI2C6- HALB131
1023.	CH19_6- C12xI2C6- HALB131
1024.	CH19_6- A7xI2C6- HALB131
1025.	CH19_6- G8xI2C6- HALB131
1026.	CH19_6- F9xI2C6- HALB131
1027.	CH19_0- C11xI2C6- HALB131
1028.	CH19_8- F6xI2C6-

	HALB131
1029.	CH19_0- G9xI2C6- HALB131
1030.	CH19_1- E11xI2C6- HALB131
1031.	CH19_0- F5xI2C6- HALB131
1032.	CH19_1- E1xI2C6- HALB131
1033.	CH19_1- E6xI2C6- HALB131
1034.	CH19_2G6_3 02xI2C6- HALB131
1035.	CH19_2G6_3 02_VKGxI2C6- HALB135
1036.	CH19_0- E11xI2C6- HALB135
1037.	CH19_5- G4xI2C6- HALB135
1038.	CH19_8- H6xI2C6- HALB135
1039.	CH19_2- C11xI2C6- HALB135

1040.	CH19_2- A10xI2C6- HALB135
1041.	CH19_1- D11xI2C6- HALB135
1042.	CH19_9- F9xI2C6- HALB135
1043.	CH19_1- H8xI2C6- HALB135
1044.	CH19_1- B12xI2C6- HALB135
1045.	CH19_0- C4xI2C6- HALB135
1046.	CH19_3- F2xI2C6- HALB135
1047.	CH19_3- B10xI2C6- HALB135
1048.	CH19_0- G4xI2C6- HALB135
1049.	CH19_0- H5xI2C6- HALB135
1050.	CH19_0- B8xI2C6- HALB135
1051.	CH19_2-

	D9xI2C6- HALB135
1052.	CH19_8- H7xI2C6- HALB135
1053.	CH19_9- C2xI2C6- HALB135
1054.	CH19_3- D5xI2C6- HALB135
1055.	CH19_1- G11xI2C6- HALB135
1056.	CH19_1- H11xI2C6- HALB135
1057.	CH19_9- F3xI2C6- HALB135
1058.	CH19_2- G6xI2C6- HALB135
1059.	CH19_2- H7xI2C6- HALB135
1060.	CH19_5- B3xI2C6- HALB135
1061.	CH19_5- E10xI2C6- HALB135
1062.	CH19_6- G10xI2C6-

	HALB135
1063.	CH19_4- H8xI2C6- HALB135
1064.	CH19_2- E4xI2C6- HALB135
1065.	CH19_6- B8xI2C6- HALB135
1066.	CH19_0- B4xI2C6- HALB135
1067.	CH19_9- F1xI2C6- HALB135
1068.	CH19_4- A7xI2C6- HALB135
1069.	CH19_6- E12xI2C6- HALB135
1070.	CH19_6- C12xI2C6- HALB135
1071.	CH19_6- A7xI2C6- HALB135
1072.	CH19_6- G8xI2C6- HALB135
1073.	CH19_6- F9xI2C6- HALB135

ES 2 973 788 T3

1074.	CH19_0- C11xI2C6- HALB135
1075.	CH19_8- F6xI2C6- HALB135
1076.	CH19_0- G9xI2C6- HALB135
1077.	CH19_1- E11xI2C6- HALB135
1078.	CH19_0- F5xI2C6- HALB135
1079.	CH19_1- E1xI2C6- HALB135
1080.	CH19_1- E6xI2C6- HALB135
1081.	CH19_2G6_3 02xI2C6- HALB135
1082.	CH19_2G6_3 02_VKGxI2C6- HALB133
1083.	CH19_0- E11xI2C6- HALB133
1084.	CH19_5- G4xI2C6- HALB133
1085.	CH19_8-

	H6xI2C6- HALB133
1086.	CH19_2- C11xI2C6- HALB133
1087.	CH19_2- A10xI2C6- HALB133
1088.	CH19_1- D11xI2C6- HALB133
1089.	CH19_9- F9xI2C6- HALB133
1090.	CH19_1- H8xI2C6- HALB133
1091.	CH19_1- B12xI2C6- HALB133
1092.	CH19_0- C4xI2C6- HALB133
1093.	CH19_3- F2xI2C6- HALB133
1094.	CH19_3- B10xI2C6- HALB133
1095.	CH19_0- G4xI2C6- HALB133
1096.	CH19_0- H5xI2C6-

	HALB133
1097.	CH19_0- B8xI2C6- HALB133
1098.	CH19_2- D9xI2C6- HALB133
1099.	CH19_8- H7xI2C6- HALB133
1100.	CH19_9- C2xI2C6- HALB133
1101.	CH19_3- D5xI2C6- HALB133
1102.	CH19_1- G11xI2C6- HALB133
1103.	CH19_1- H11xI2C6- HALB133
1104.	CH19_9- F3xI2C6- HALB133
1105.	CH19_2- G6xI2C6- HALB133
1106.	CH19_2- H7xI2C6- HALB133
1107.	CH19_5- B3xI2C6- HALB133

1108.	CH19_5- E10xI2C6- HALB133
1109.	CH19_6- G10xI2C6- HALB133
1110.	CH19_4- H8xI2C6- HALB133
1111.	CH19_2- E4xI2C6- HALB133
1112.	CH19_6- B8xI2C6- HALB133
1113.	CH19_0- B4xI2C6- HALB133
1114.	CH19_9- F1xI2C6- HALB133
1115.	CH19_4- A7xI2C6- HALB133
1116.	CH19_6- E12xI2C6- HALB133
1117.	CH19_6- C12xI2C6- HALB133
1118.	CH19_6- A7xI2C6- HALB133
1119.	CH19_6-

	G8xI2C6- HALB133
1120.	CH19_6- F9xI2C6- HALB133
1121.	CH19_0- C11xI2C6- HALB133
1122.	CH19_8- F6xI2C6- HALB133
1123.	CH19_0- G9xI2C6- HALB133
1124.	CH19_1- E11xI2C6- HALB133
1125.	CH19_0- F5xI2C6- HALB133
1126.	CH19_1- E1xI2C6- HALB133
1127.	CH19_1- E6xI2C6- HALB133
1128.	CH19_2G6_3 02xI2C6- HALB133
1129.	CH19_2G6_3 02_VKGxI2C6- CH-FcB-LH- 156
1130.	CH19_0-

	E11xI2C6-CH- FcB-LH-156
1131.	CH19_5- G4xI2C6-CH- FcB-LH-156
1132.	CH19_8- H6xI2C6-CH- FcB-LH-156
1133.	CH19_2- C11xI2C6-CH- FcB-LH-156
1134.	CH19_2- A10xI2C6-CH- FcB-LH-156
1135.	CH19_1- D11xI2C6-CH- FcB-LH-156
1136.	CH19_9- F9xI2C6-CH- FcB-LH-156
1137.	CH19_1- H8xI2C6-CH- FcB-LH-156
1138.	CH19_1- B12xI2C6-CH- FcB-LH-156
1139.	CH19_0- C4xI2C6-CH- FcB-LH-156
1140.	CH19_3- F2xI2C6-CH- FcB-LH-156
1141.	CH19_3- B10xI2C6-CH-

	FcB-LH-156
1142.	CH19_0- G4xI2C6-CH- FcB-LH-156
1143.	CH19_0- H5xI2C6-CH- FcB-LH-156
1144.	CH19_0- B8xI2C6-CH- FcB-LH-156
1145.	CH19_2- D9xI2C6-CH- FcB-LH-156
1146.	CH19_8- H7xI2C6-CH- FcB-LH-156
1147.	CH19_9- C2xI2C6-CH- FcB-LH-156
1148.	CH19_3- D5xI2C6-CH- FcB-LH-156
1149.	CH19_1- G11xI2C6-CH- FcB-LH-156
1150.	CH19_1- H11xI2C6-CH- FcB-LH-156
1151.	CH19_9- F3xI2C6-CH- FcB-LH-156
1152.	CH19_2- G6xI2C6-CH- FcB-LH-156

1153.	CH19_2- H7xI2C6-CH- FcB-LH-156
1154.	CH19_5- B3xI2C6-CH- FcB-LH-156
1155.	CH19_5- E10xI2C6-CH- FcB-LH-156
1156.	CH19_6- G10xI2C6-CH- FcB-LH-156
1157.	CH19_4- H8xI2C6-CH- FcB-LH-156
1158.	CH19_2- E4xI2C6-CH- FcB-LH-156
1159.	CH19_6- B8xI2C6-CH- FcB-LH-156
1160.	CH19_0- B4xI2C6-CH- FcB-LH-156
1161.	CH19_9- F1xI2C6-CH- FcB-LH-156
1162.	CH19_4- A7xI2C6-CH- FcB-LH-156
1163.	CH19_6- E12xI2C6-CH- FcB-LH-156
1164.	CH19_6-

	C12x12C6-CH-FcB-LH-156		FcB-LH-156		FcB-LY-156	1198.	CH19_9-F3x12C6-CH-FcB-LY-156
1165.	CH19_6-A7x12C6-CH-FcB-LH-156	1176.	CH19_2G6_3O2_VKGx12C6-CH-FcB-LY-156	1187.	CH19_3-F2x12C6-CH-FcB-LY-156	1199.	CH19_2-G6x12C6-CH-FcB-LY-156
1166.	CH19_6-G8x12C6-CH-FcB-LH-156	1177.	CH19_0-E11x12C6-CH-FcB-LY-156	1188.	CH19_3-B10x12C6-CH-FcB-LY-156	1200.	CH19_2-H7x12C6-CH-FcB-LY-156
1167.	CH19_6-F9x12C6-CH-FcB-LH-156	1178.	CH19_5-G4x12C6-CH-FcB-LY-156	1189.	CH19_0-G4x12C6-CH-FcB-LY-156	1201.	CH19_5-B3x12C6-CH-FcB-LY-156
1168.	CH19_0-C11x12C6-CH-FcB-LH-156	1179.	CH19_8-H6x12C6-CH-FcB-LY-156	1190.	CH19_0-H5x12C6-CH-FcB-LY-156	1202.	CH19_5-E10x12C6-CH-FcB-LY-156
1169.	CH19_8-F6x12C6-CH-FcB-LH-156	1180.	CH19_2-C11x12C6-CH-FcB-LY-156	1191.	CH19_0-B8x12C6-CH-FcB-LY-156	1203.	CH19_6-G10x12C6-CH-FcB-LY-156
1170.	CH19_0-G9x12C6-CH-FcB-LH-156	1181.	CH19_2-A10x12C6-CH-FcB-LY-156	1192.	CH19_2-D9x12C6-CH-FcB-LY-156	1204.	CH19_4-H8x12C6-CH-FcB-LY-156
1171.	CH19_1-E11x12C6-CH-FcB-LH-156	1182.	CH19_1-D11x12C6-CH-FcB-LY-156	1193.	CH19_8-H7x12C6-CH-FcB-LY-156	1205.	CH19_2-E4x12C6-CH-FcB-LY-156
1172.	CH19_0-F5x12C6-CH-FcB-LH-156	1183.	CH19_9-F9x12C6-CH-FcB-LY-156	1194.	CH19_9-C2x12C6-CH-FcB-LY-156	1206.	CH19_6-B8x12C6-CH-FcB-LY-156
1173.	CH19_1-E1x12C6-CH-FcB-LH-156	1184.	CH19_1-H8x12C6-CH-FcB-LY-156	1195.	CH19_3-D5x12C6-CH-FcB-LY-156	1207.	CH19_0-B4x12C6-CH-FcB-LY-156
1174.	CH19_1-E6x12C6-CH-FcB-LH-156	1185.	CH19_1-B12x12C6-CH-FcB-LY-156	1196.	CH19_1-G11x12C6-CH-FcB-LY-156	1208.	CH19_9-F1x12C6-CH-FcB-LY-156
1175.	CH19_2G6_3O2x12C6-CH-	1186.	CH19_0-C4x12C6-CH-	1197.	CH19_1-H11x12C6-CH-FcB-LY-156	1209.	CH19_4-

	A7x12C6-CH-FcB-LY-156		FcB-LY-156	1228.	ckCDH19(1-43)::FLAG::ckCDH19(44-141)::huCDH19(142-249)::ckCDH19(250-776) construct L	1233.	Human CD3e extracellular domain
1210.	CH19_6-E12x12C6-CH-FcB-LY-156	1221.	CH19_1-E6x12C6-CH-FcB-LY-156			1234.	Human CD3e 1-27
1211.	CH19_6-C12x12C6-CH-FcB-LY-156	1222.	CH19_2G6_3O2x12C6-CH-FcB-LY-156	1229.	ckCDH19(1-43)::FLAG::ckCDH19(44-249)::huCDH19(250-364)::ckCDH19(365-776) construct M	1235.	Callithrix jacchus CD3e extracellular domain
1212.	CH19_6-A7x12C6-CH-FcB-LY-156	1223.	Human Cadherin-19 Construct A	1230.	ckCDH19(1-43)::FLAG::ckCDH19(44-364)::huCDH19(365-776) construct N	1236.	Callithrix jacchus CD3e 1-27
1213.	CH19_6-G8x12C6-CH-FcB-LY-156	1224.	Cyno Cadherin-19 Macaca fascicularis secreted	1231.	(1-43)::FLAG::ckCDH19(44-468)::huCDH19(464-772) construct O	1237.	Saguinus oedipus CD3e extracellular domain
1214.	CH19_6-F9x12C6-CH-FcB-LY-156	1225.	Cadherin-19 ecto-domain (amino acids 1-596) human	1232.	huCDH19(1-43)::FLAG::huCDH19(44-141)::ckCDH19(142-776) construct K	1238.	Saguinus oedipus CD3e 1-27
1215.	CH19_0-C11x12C6-CH-FcB-LY-156	1226.	ckCDH19(1-43)::FLAG::ckCDH19(44-776) construct J			1239.	Saimiri sciureus CD3e extracellular domain
1216.	CH19_8-F6x12C6-CH-FcB-LY-156					1240.	Saimiri sciureus CD3e 1-27
1217.	CH19_0-G9x12C6-CH-FcB-LY-156						
1218.	CH19_1-E11x12C6-CH-FcB-LY-156						
1219.	CH19_0-F5x12C6-CH-FcB-LY-156						
1220.	CH19_1-E1x12C6-CH-						

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de anticuerpo biespecífica que comprende un primer dominio de unión humano que se une a CDH19 humano sobre la superficie de una célula diana y un segundo dominio de unión que se une a CD3 humano sobre la superficie de una célula T, donde la construcción de anticuerpo está en el formato (scFv)₂,

5 donde el primer dominio de unión comprende una región VH y una región VL seleccionadas del grupo que consiste en:

pares de una región VH y una región VL seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8+10, SEQ ID NO: 21+23, SEQ ID NO: 34+36, SEQ ID NO: 73+75, SEQ ID NO: 86+88, SEQ ID NO: 99+101, SEQ ID NO: 112+114, SEQ ID NO: 125+127, SEQ ID NO: 138+140, SEQ ID NO: 164+166, SEQ ID NO: 177+179, SEQ ID NO: 190+192, SEQ ID NO: 229+231, SEQ ID NO: 281+283, SEQ ID NO: 294+296, SEQ ID NO: 307+309, SEQ ID NO: 320+322, SEQ ID NO: 333+335, SEQ ID NO: 346+348, SEQ ID NO: 385+387, SEQ ID NO: 398+400, SEQ ID NO: 424+426, SEQ ID NO: 437+439, SEQ ID NO: 476+478, SEQ ID NO: 502+504, SEQ ID NO: 515+517, SEQ ID NO: 528+530, SEQ ID NO: 541+543, SEQ ID NO: 554+556, SEQ ID NO: 580+582 y SEQ ID NO: 606+608,

y donde el segundo dominio de unión comprende una región VH que comprende la secuencia

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYY
ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTIVTS

S

y una región VH que comprende la secuencia

QTVVTQEPSTLVSPGGTIVLTGSSSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPA
RFGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL.

2. La construcción de anticuerpo según la reivindicación 1, donde el primer dominio de unión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las representadas en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 350, SEQ ID NO: 389, SEQ ID NO: 402, SEQ ID NO: 428, SEQ ID NO: 441, SEQ ID NO: 480, SEQ ID NO: 506, SEQ ID NO: 519, SEQ ID NO: 532, SEQ ID NO: 545, SEQ ID NO: 558, SEQ ID NO: 584 y SEQ ID NO: 610.

3. La construcción de anticuerpo según la reivindicación 1, que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las representadas en

SEQ ID NOs: 13, 26, 39, 78, 91, 104, 117, 130, 143, 169, 182, 195, 234, 286, 299, 312, 325, 338, 351, 390, 403, 429, 442, 481, 507, 520, 533, 546, 559, 585, 611, 612, 613, 614, 617-622, 624-626, 629, 633-636, 637, 638, 641, 642, 644, 645, 648, 650, 651-654, 656, 658, 659, 660, 661, 664-669, 671-673, 676, 680-683, 684, 685, 688, 689, 691, 692, 695, 697, 698-701, 703, 705, 706, 707, 708, 711-716, 718-720, 723, 727-730, 731, 732, 735, 736, 738, 739, 742, 744, 745-748, 750, 752, 753, 754, 755, 758-763, 765-767, 770, 774-777, 778, 779, 782, 783, 785, 786, 789, 791, 792-795, 797, 799, 800, 801, 802, 805-810, 812-814, 817, 821-824, 825, 826, 829, 830, 832, 833, 836, 838, 839-842, 844, 846, 847, 848, 849, 852-857, 859-861, 864, 868-871, 872, 873, 876, 877, 879, 880, 883, 885, 886-889, 891, 893, 894, 895, 896, 899-904, 906-908, 911, 915-918, 919, 920, 923, 924, 926, 927, 930, 932, 933-936, 938, 940, 941, 942, 943, 946-951, 953-955, 958, 962-965, 966, 967, 970, 971, 973, 974, 977, 979, 980-983, 985, 987, 988, 989, 990, 993-998, 1000-1002, 1005, 1009-1012, 1013, 1014, 1017, 1018, 1020, 1021, 1024, 1026, 1027-1030, 1032, 1034, 1035, 1036, 1037, 1040-1045, 1047-1049, 1052, 1056-1059, 1060, 1061, 1064, 1065, 1067, 1068, 1071, 1073, 1074-1077, 1079, 1081, 1082, 1083, 1084, 1087-1092, 1094-1096, 1099, 1103-1106, 1107, 1108, 1111, 1112, 1114, 1115, 1118, 1120, 1121-1124, 1126, 1128, 1129, 1130, 1131, 1134-1139, 1141-1143, 1146, 1150-1153, 1154, 1155, 1158, 1159, 1161, 1162, 1165, 1167, 1168-1171, 1173, 1175, 1176, 1177, 1178, 1181-1186, 1188-1190, 1193, 1197-1200, 1201, 1202, 1205, 1206, 1208, 1209, 1212, 1214, 1215-1218, 1220, 1222, 1223, 1224, 1225, 1228-1233, 1235-1237, 1240, 1244-1247, 1248, 1249, 1252, 1253, 1255, 1256, 1259, 1261, 1262-1265, 1267, 1269, 1270, 1271, 1272, 1275-1280, 1282-1284, 1287, 1291-1294, 1295, 1296, 1299, 1300, 1302, 1303, 1306, 1308, 1309-1312, 1314, 1316, 1317, 1318, 1319, 1322-1327, 1329-1331, 1334, 1338-1341, 1342, 1343, 1346, 1347, 1349, 1350, 1353, 1355, 1356-1359, 1361, 1363, 1364, 1365, 1366, 1369-1374, 1376-1378, 1381, 1385-1388, 1389, 1390, 1393, 1394, 1396, 1397, 1400, 1402, 1403-1406, 1408, 1410, 1411, 1412, 1413, 1416-1421, 1423-1425, 1428, 1432-1435, 1436, 1437, 1440, 1441, 1443, 1444, 1447, 1449, 1450-1453, 1455, 1457, 1458, 1459, 1460, 1463-1468, 1470-1472, 1475, 1479-1482, 1483, 1484, 1487, 1488, 1490, 1491, 1494, 1496, 1497-1500, 1502, 1504, 1505, 1506, 1507, 1510-1515, 1517-1519, 1522, 1526-1529, 1530, 1531, 1534, 1535, 1537, 1538, 1541, 1543, 1544-1547, 1549, 1551, 1552, 1553, 1554, 1557-1562, 1564-1566, 1569, 1573-1576, 1577, 1578, 1581, 1582, 1584, 1585, 1588, 1590, 1591-1594, 1596, 1598, 1599, 1600, 1601, 1604-1609, 1611-1613, 1616, 1620-1623, 1624, 1625, 1628, 1629, 1631, 1632, 1635, 1637, 1638-1641, 1643, 1645, 1646, 1647, 1648, 1651-1656, 1658-1660, 1663, 1667-1670, 1671, 1672, 1675, 1676, 1678, 1679, 1682, 1684, 1685-1688, 1690, 1692, 1693, 1694, 1695, 1698-1703, 1705-1707, 1710, 1714-1717, 1718, 1719, 1722, 1723, 1725, 1726, 1729, 1731, 1732-1735, 1737, 1739, 1740, 1741, 1742, 1745-1750, 1752-1754, 1757, 1761-1764, 1765, 1766, 1769, 1770, 1772,

1773, 1776, 1778, 1779-1782, 1784, 1786, 1787, 1788, 1789, 1792-1797, 1799-1801, 1804, 1808-1811, 1812, 1813, 1816, 1817, 1819, 1820, 1823, 1825, 1826-1829, 1831 y 1833.

4. Un polinucleótido que codifica una construcción de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 4.

5 6. Una célula anfitriona transformada o transfectada con el polinucleótido según la reivindicación 4 o con el vector según la reivindicación 5.

10 7. Un procedimiento para la producción de una construcción de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo dicho procedimiento cultivar una célula anfitriona según la reivindicación 6 bajo condiciones que permitan la expresión de la construcción de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y recuperar la construcción de anticuerpo producida del cultivo.

8. Una composición farmacéutica que comprende una construcción de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o producida según el procedimiento de la reivindicación 7.

15 9. La construcción de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o producida según el procedimiento de la reivindicación 7, para el uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad de tipo melanoma o una enfermedad de tipo melanoma metastásico.

10. La construcción de anticuerpo para el uso según la reivindicación 9, donde la enfermedad de tipo melanoma o la enfermedad de tipo melanoma metastásico se selecciona del grupo que consiste en melanoma de extensión superficial, lentigo maligno, melanoma sobre lentigo maligno, melanoma lentiginoso acro y melanoma nodular.

20 11. Un estuche que comprende una construcción de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, una construcción de anticuerpo producida según el procedimiento de la reivindicación 7, un vector según la reivindicación 5 y/o una célula anfitriona según la reivindicación 6.

Figura 1

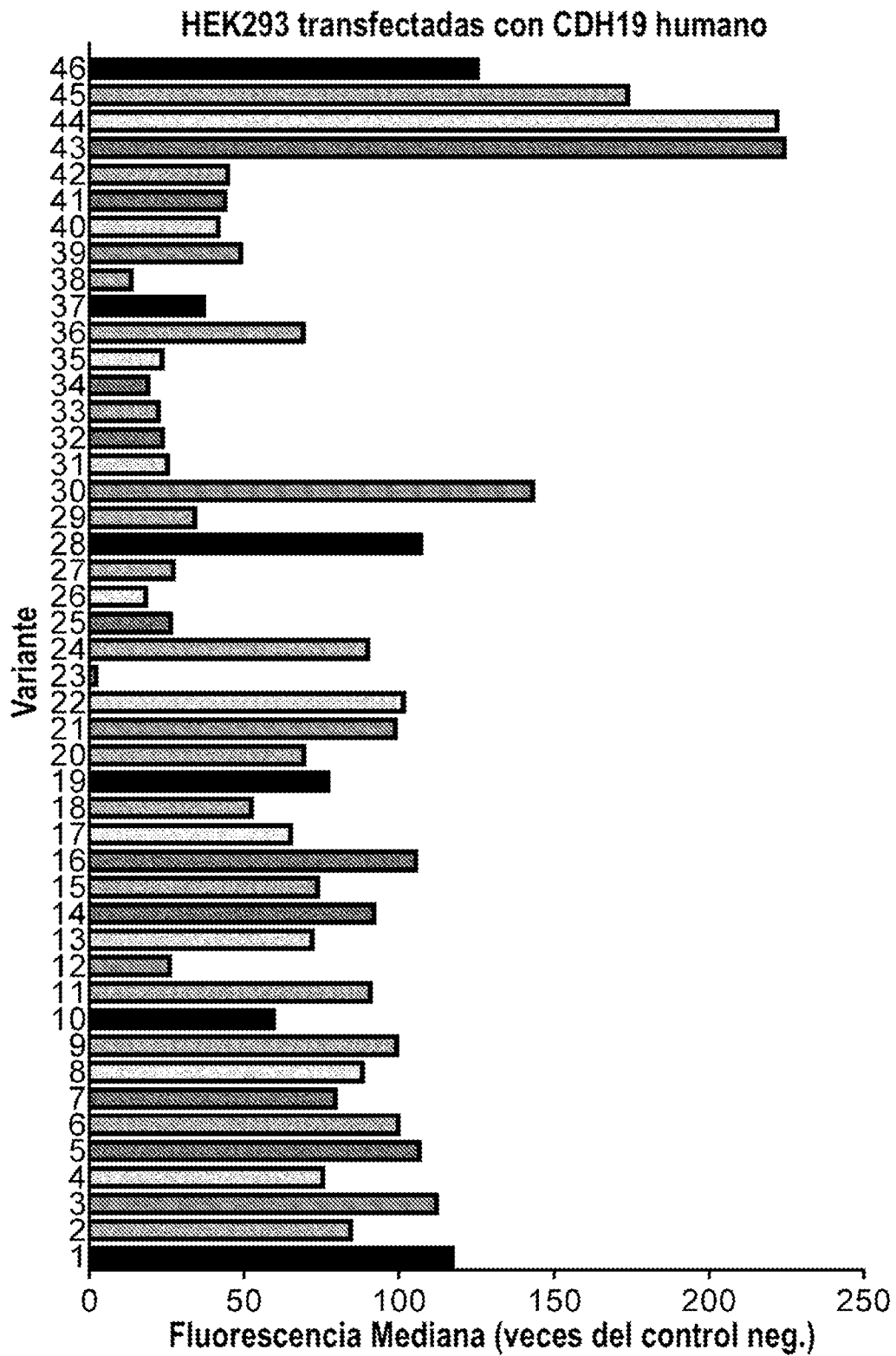


Figura 2

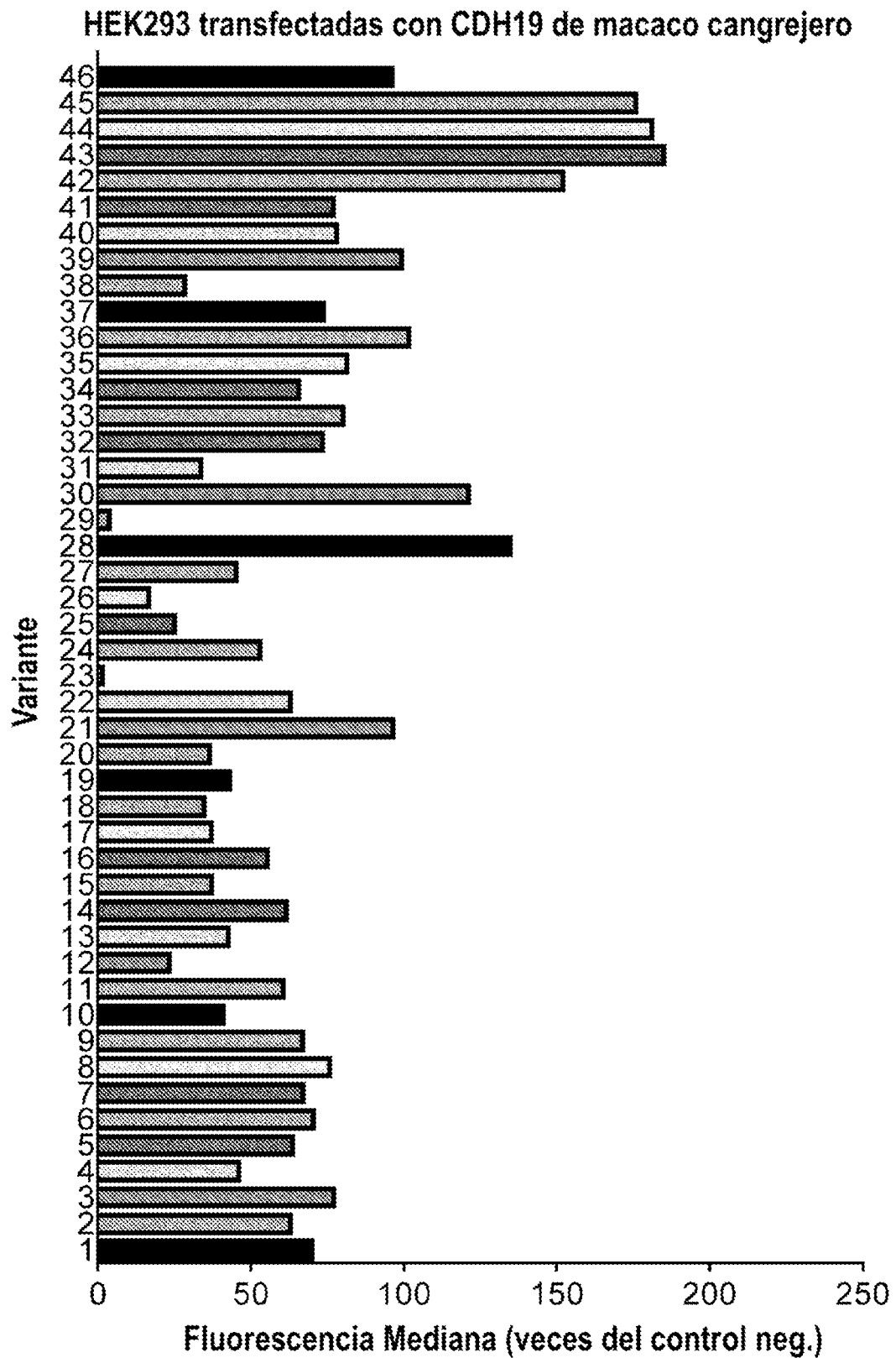


Figura 3

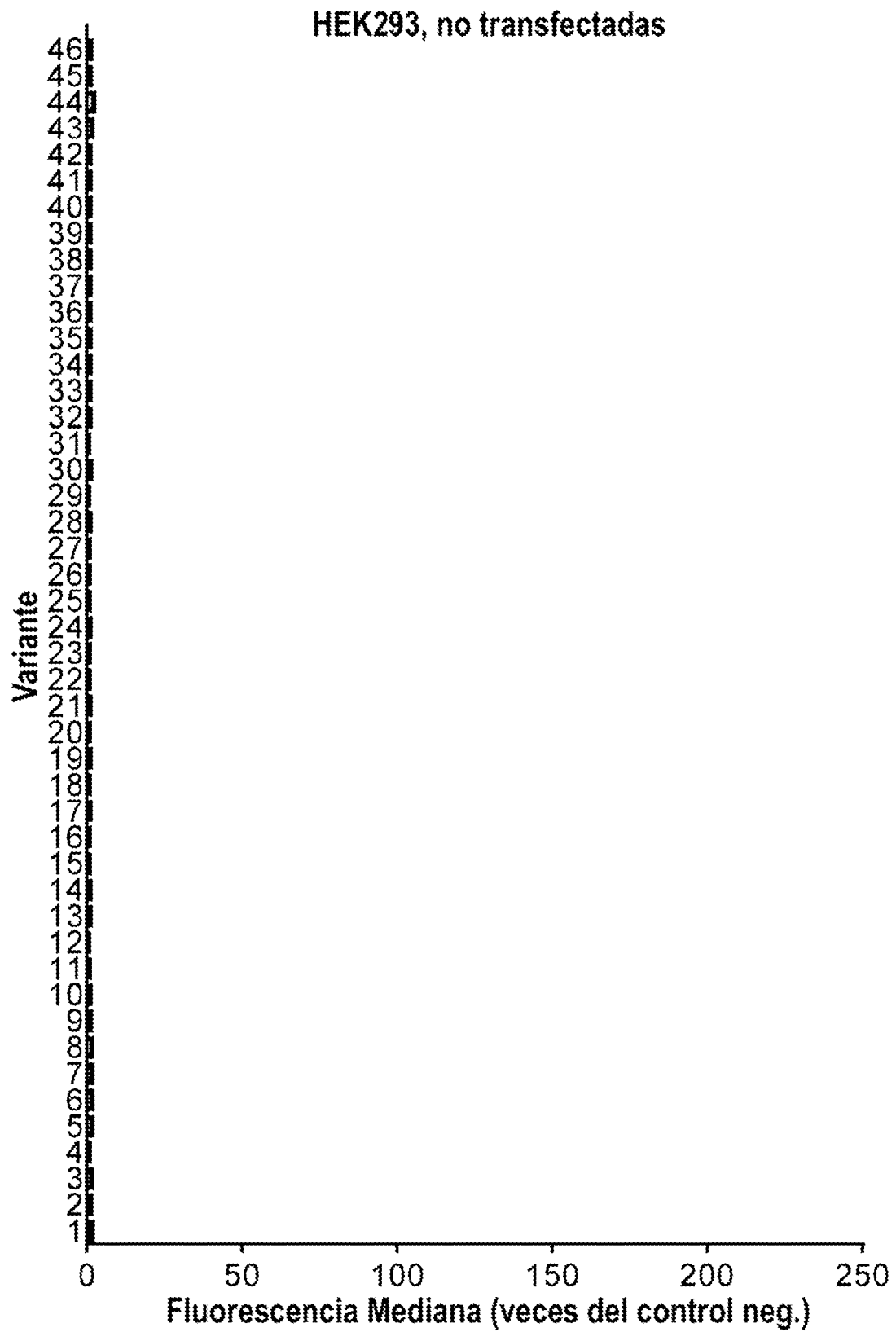


Figura 4

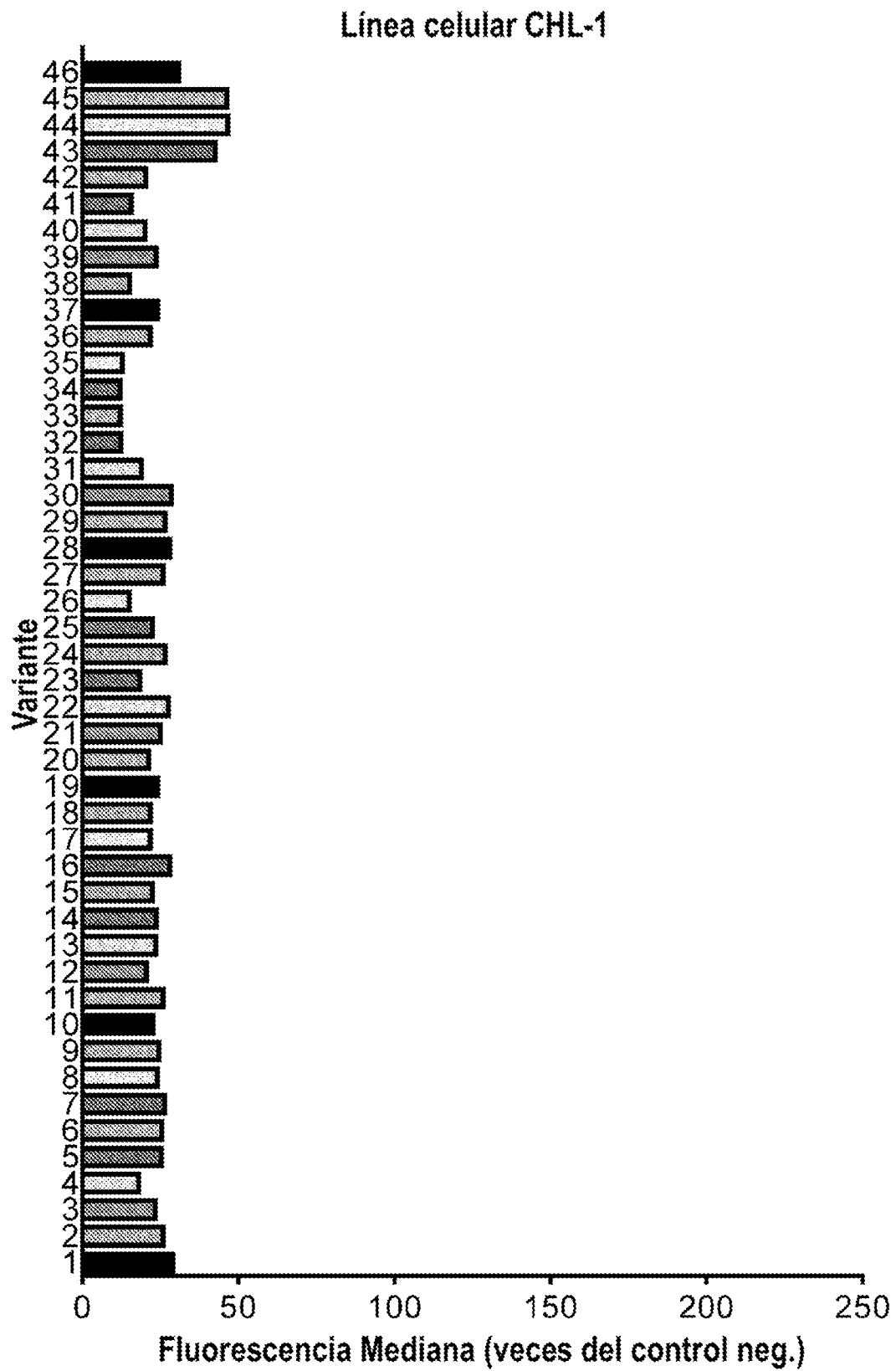


Figura 5

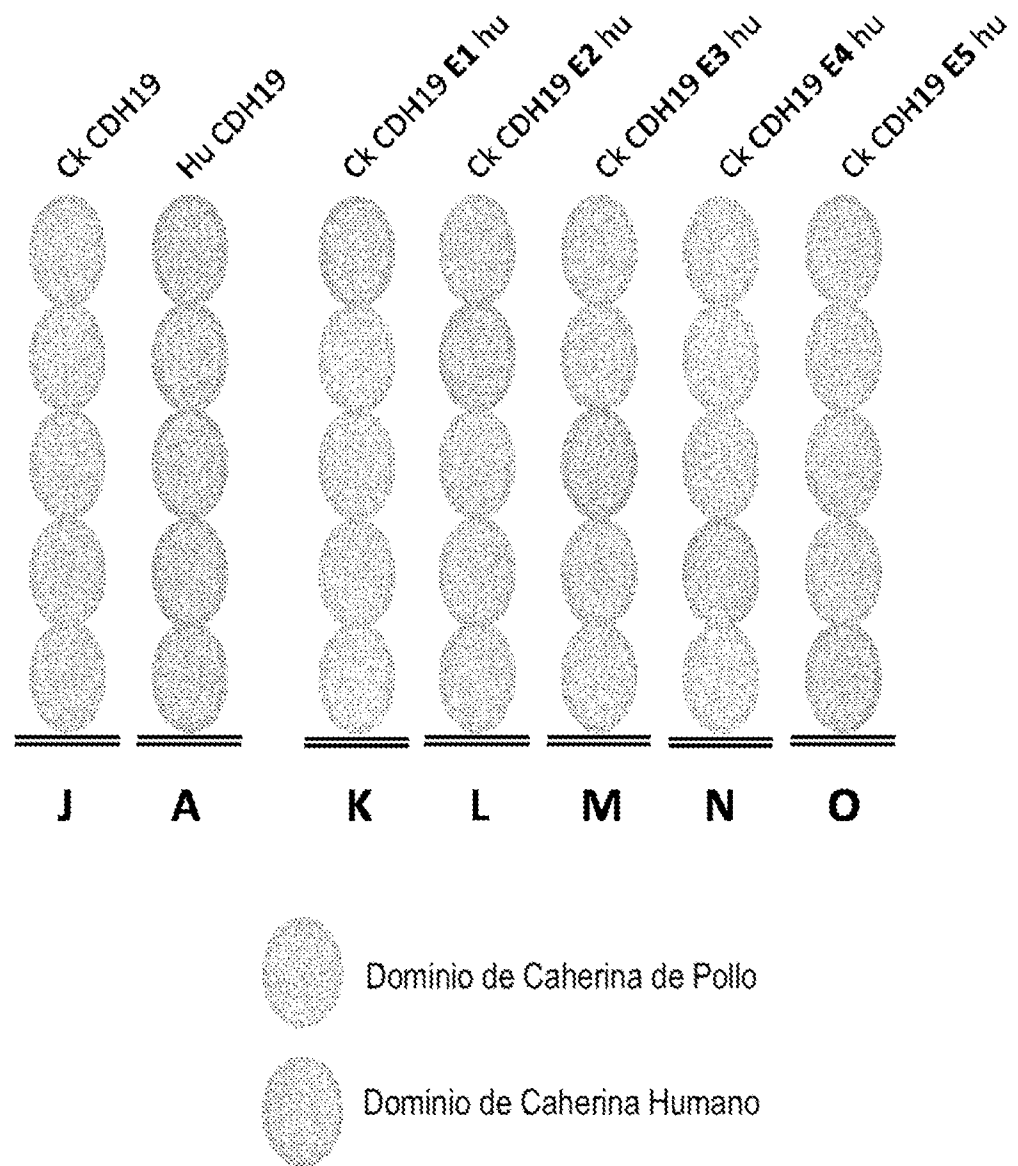


Figura 6

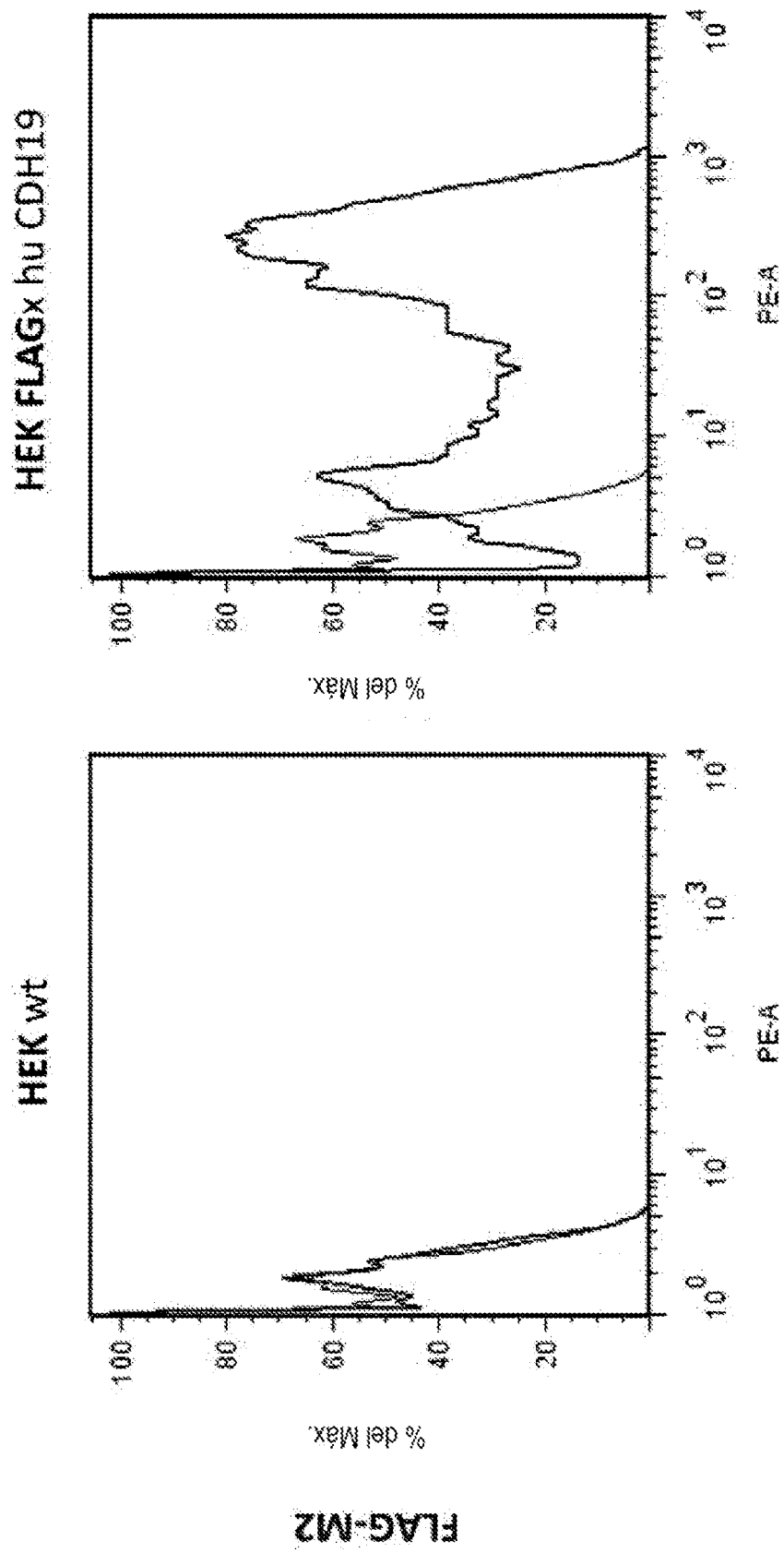


Figura 6 (continuación)

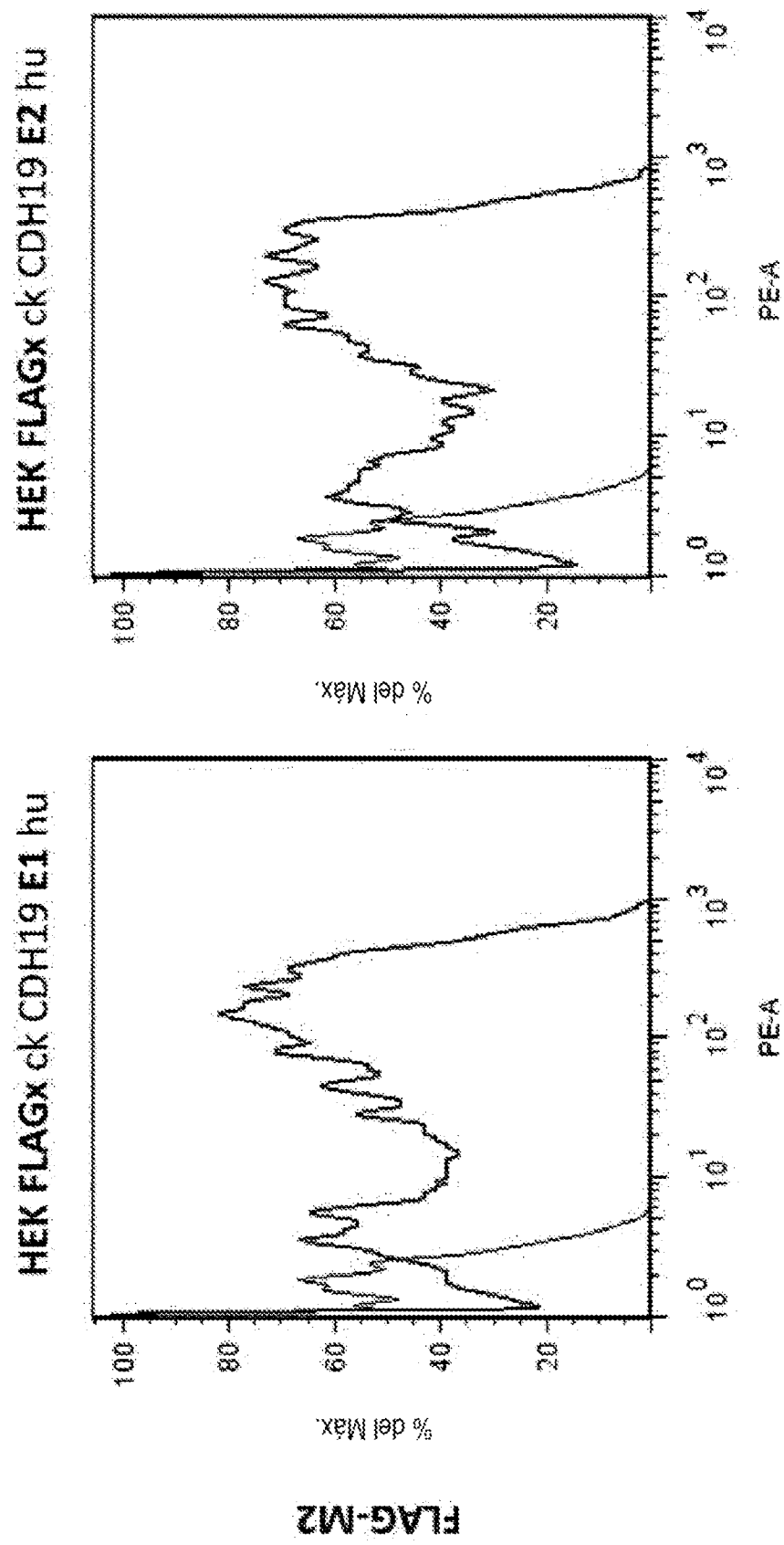


Figura 6 (continuación)

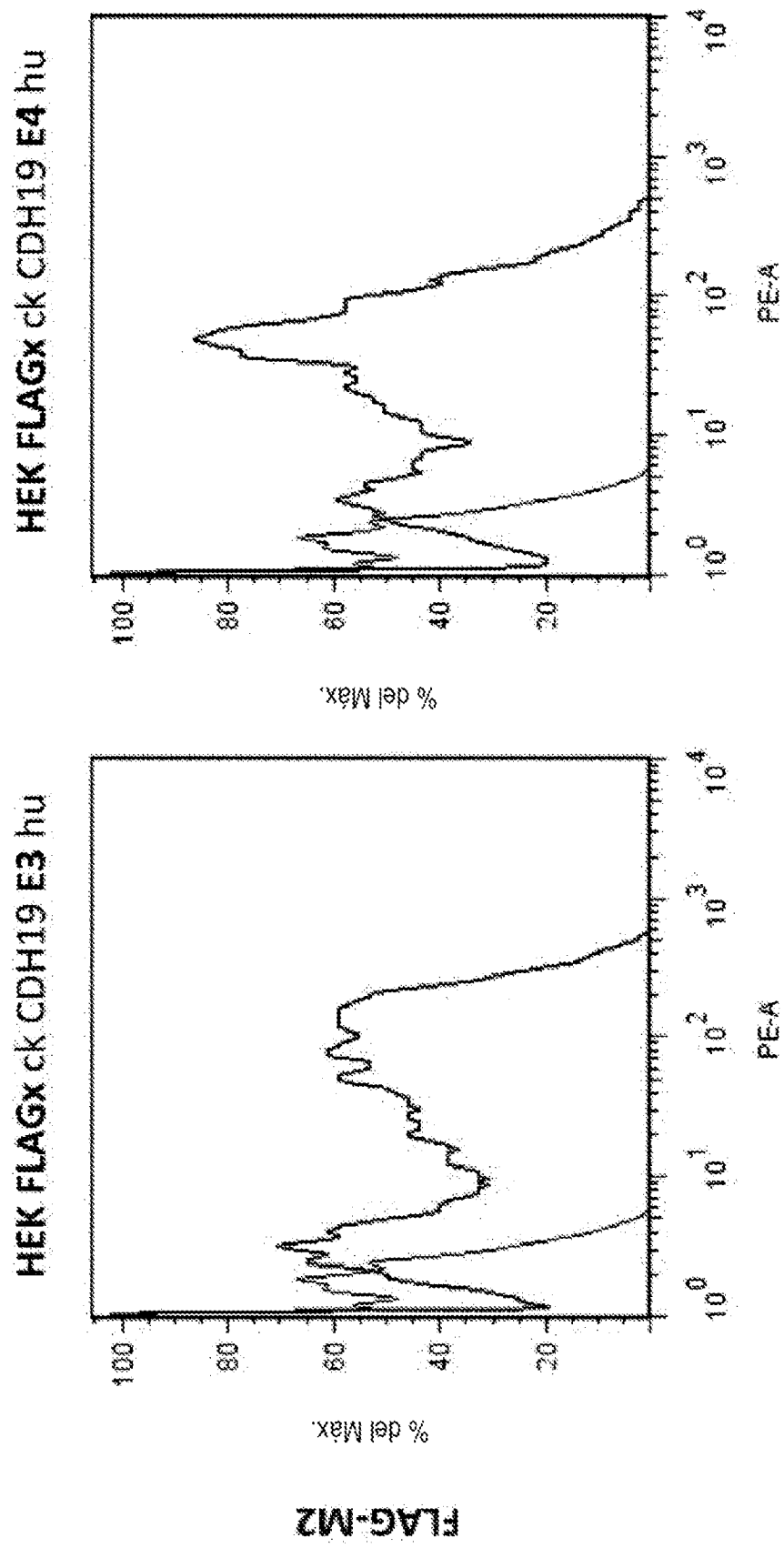


Figura 6 (continuación)

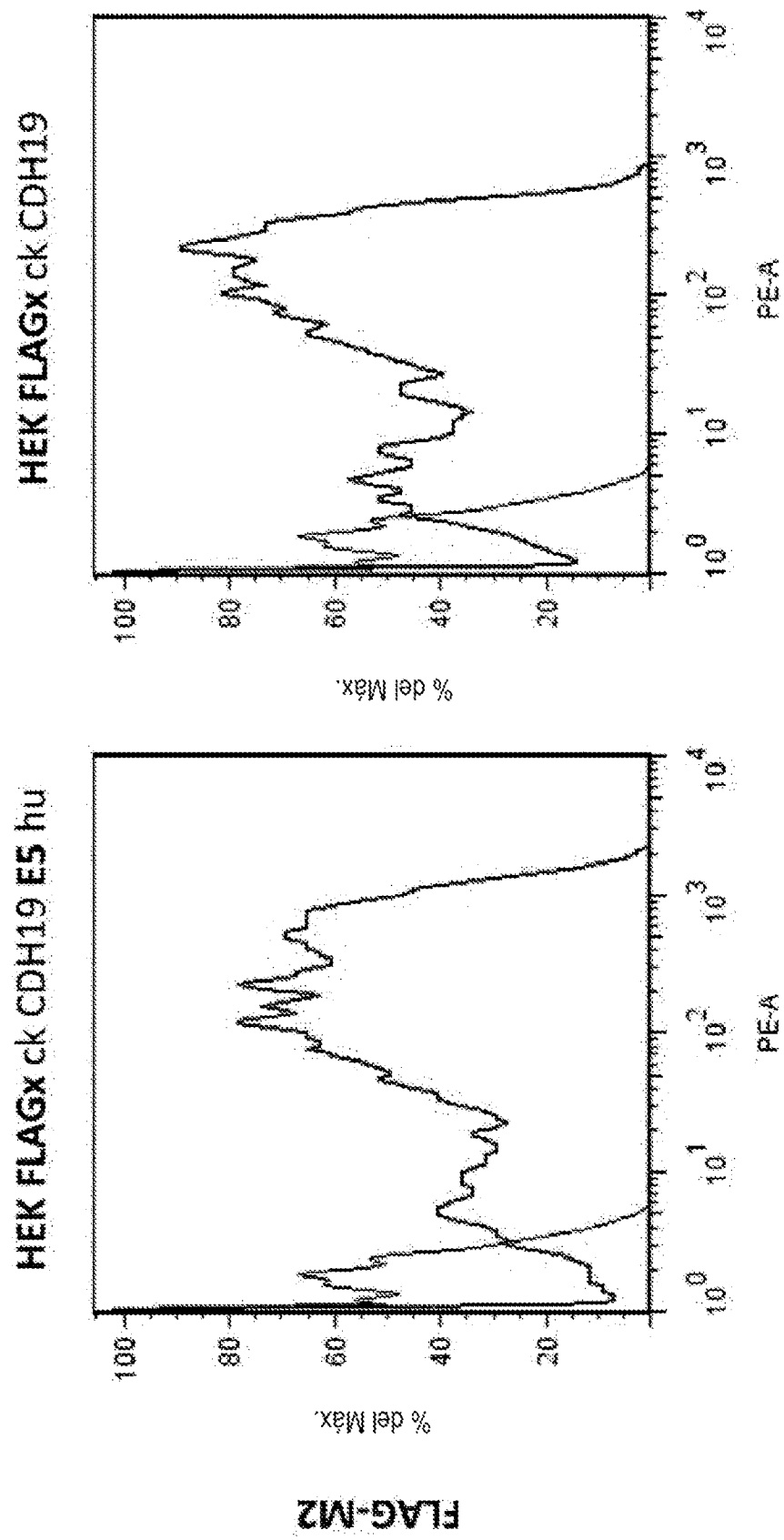


Figura 6 (continuación)

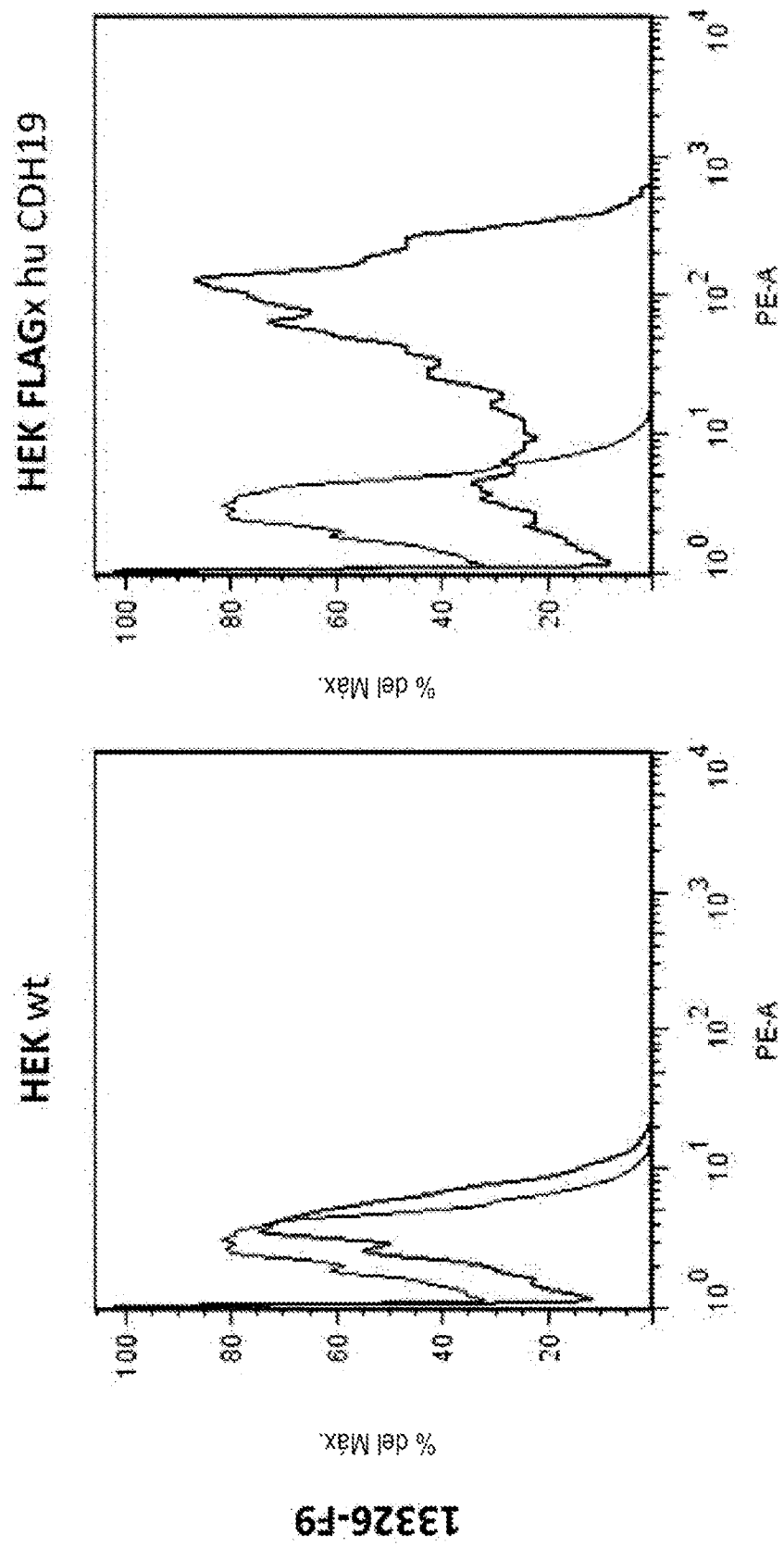


Figura 6 (continuación)

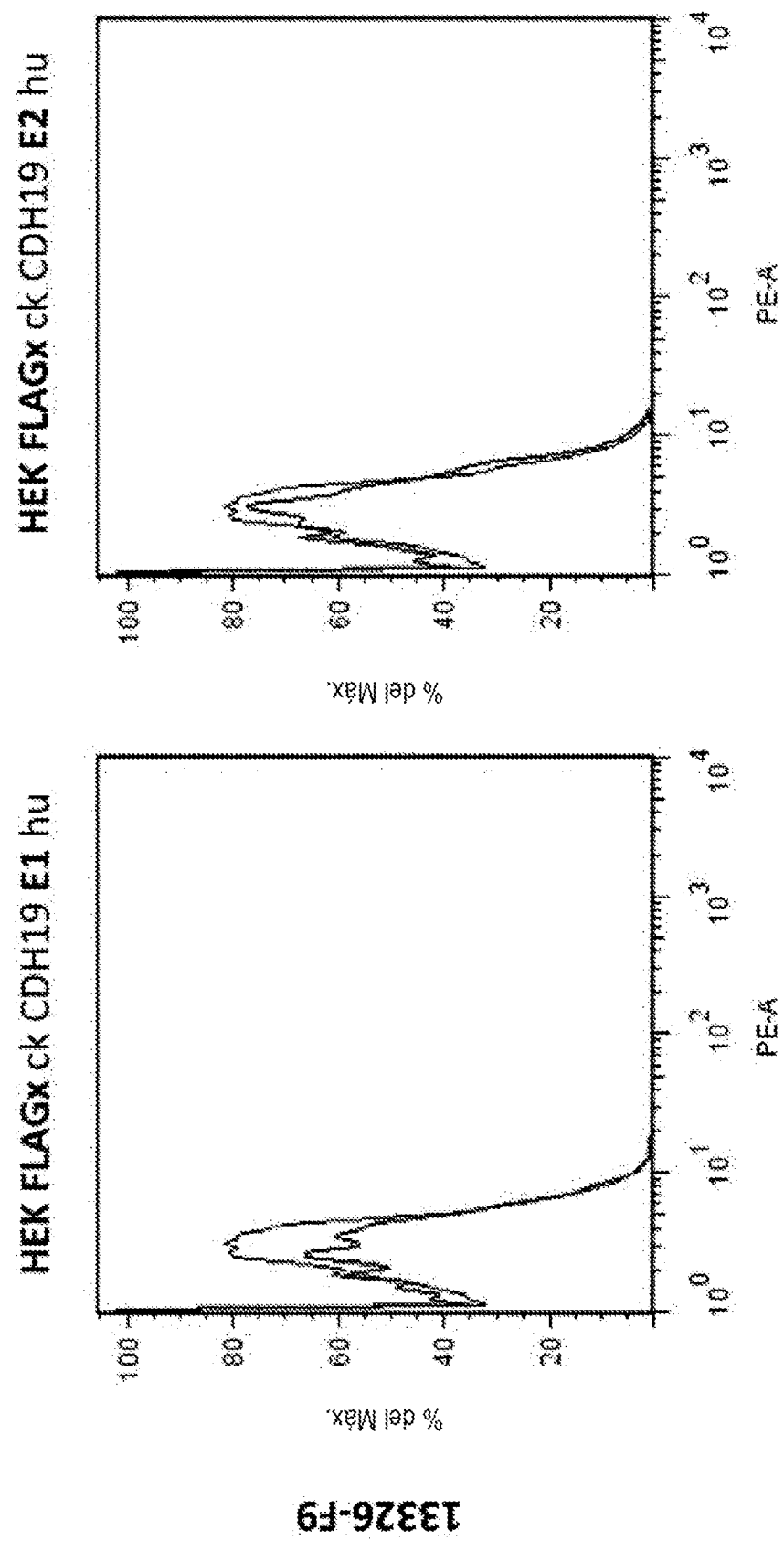


Figura 6 (continuación)

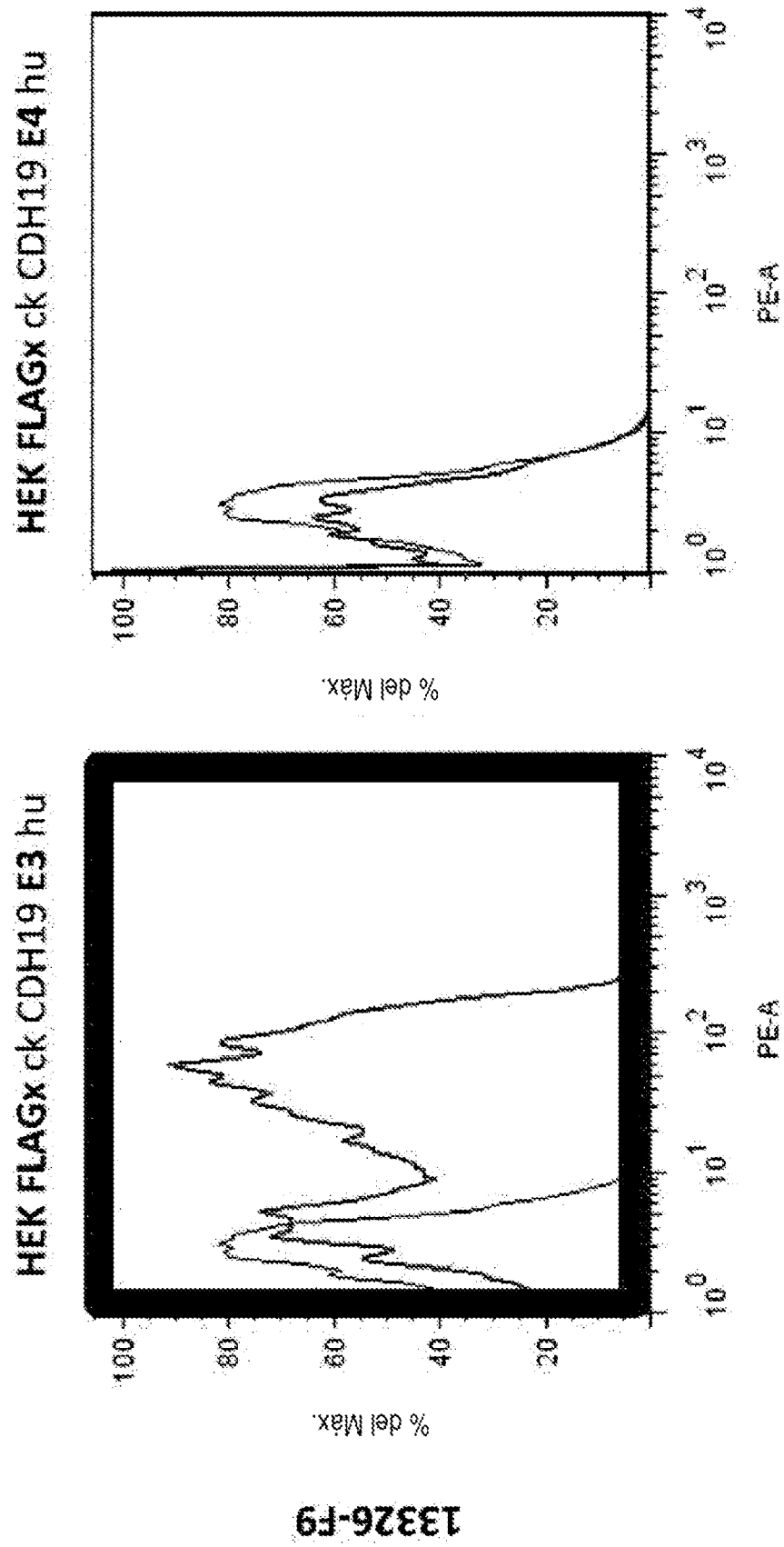


Figura 6 (continuación)

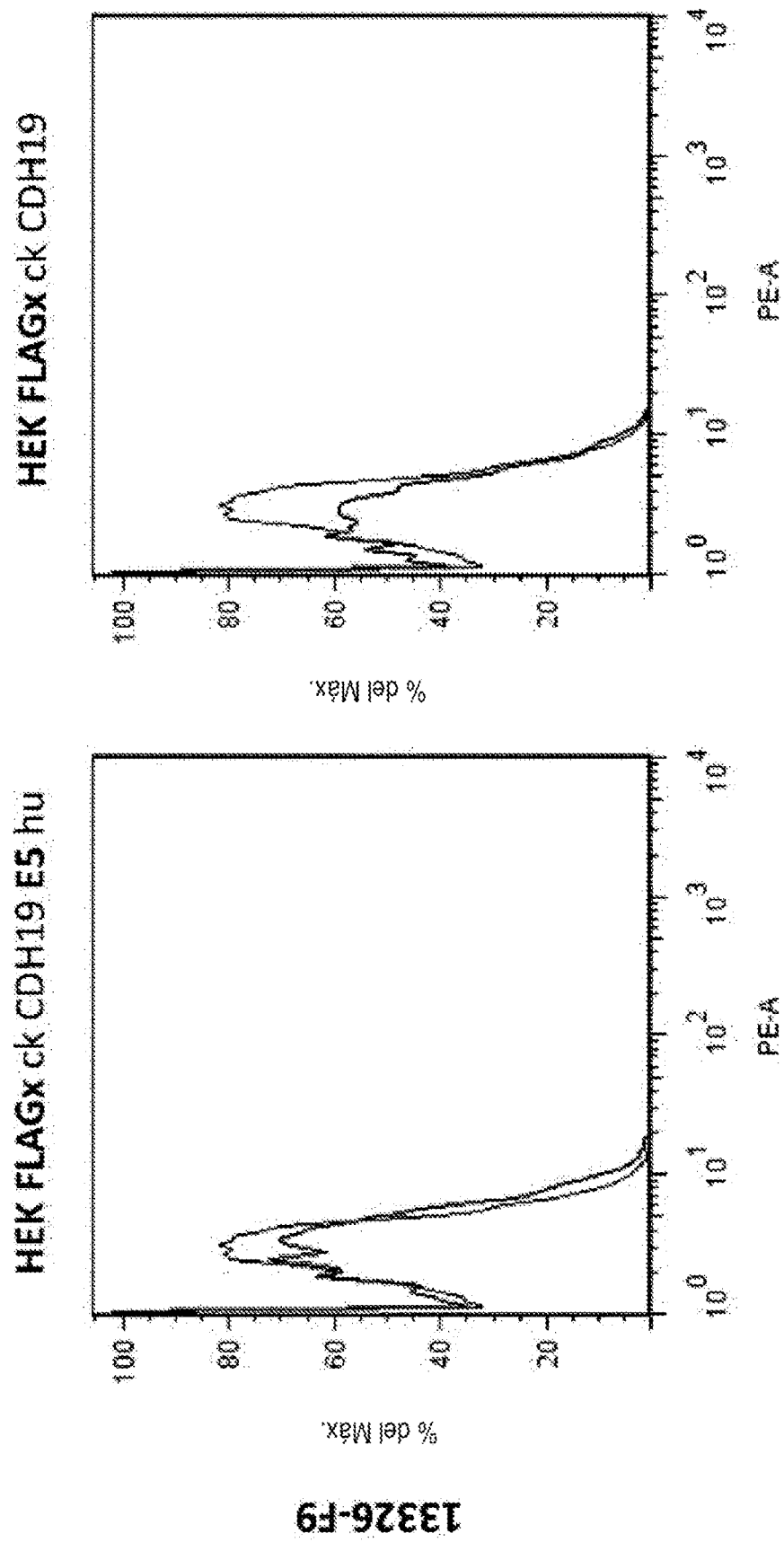


Figura 6 (continuación)

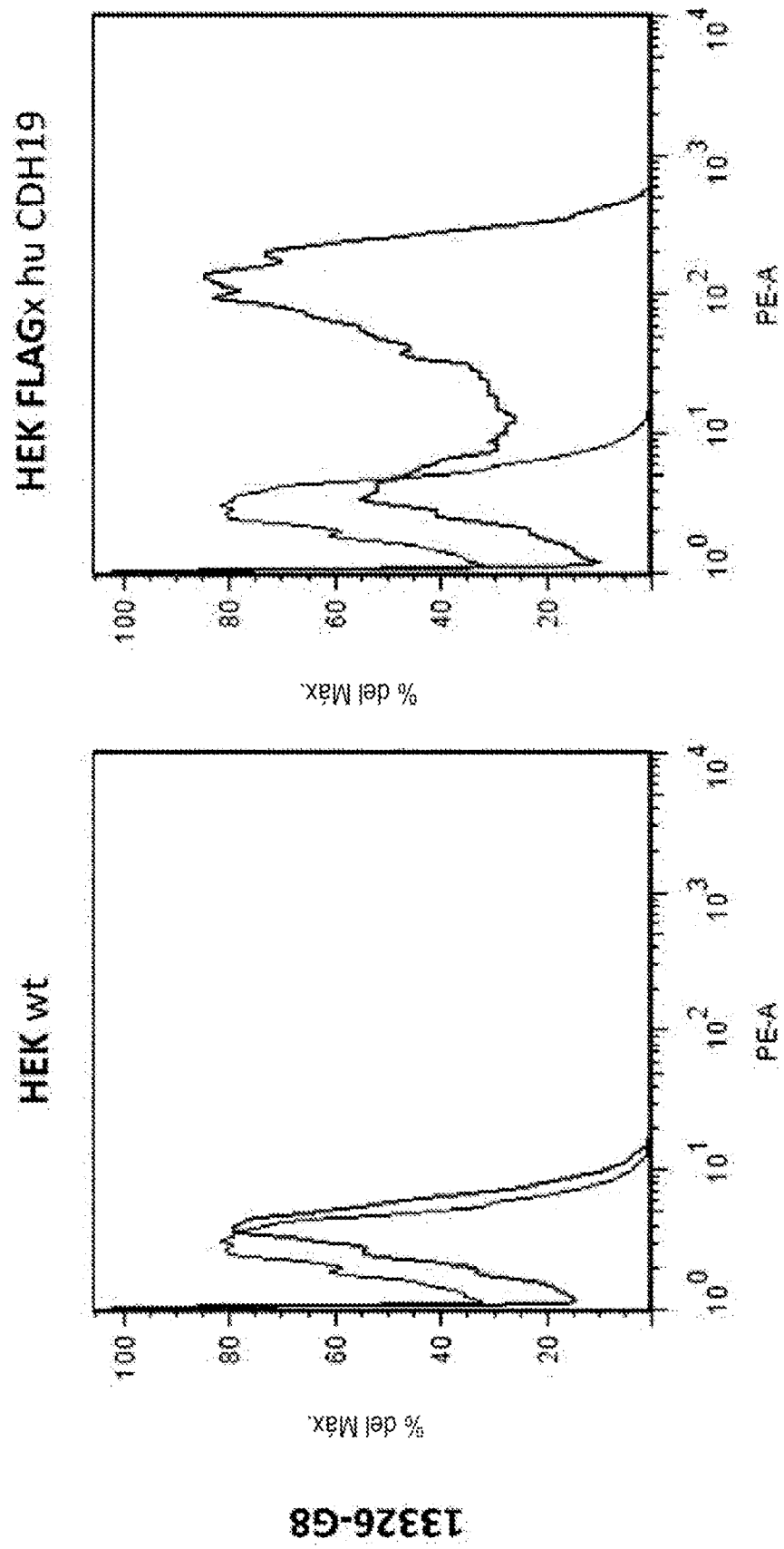


Figura 6 (continuación)

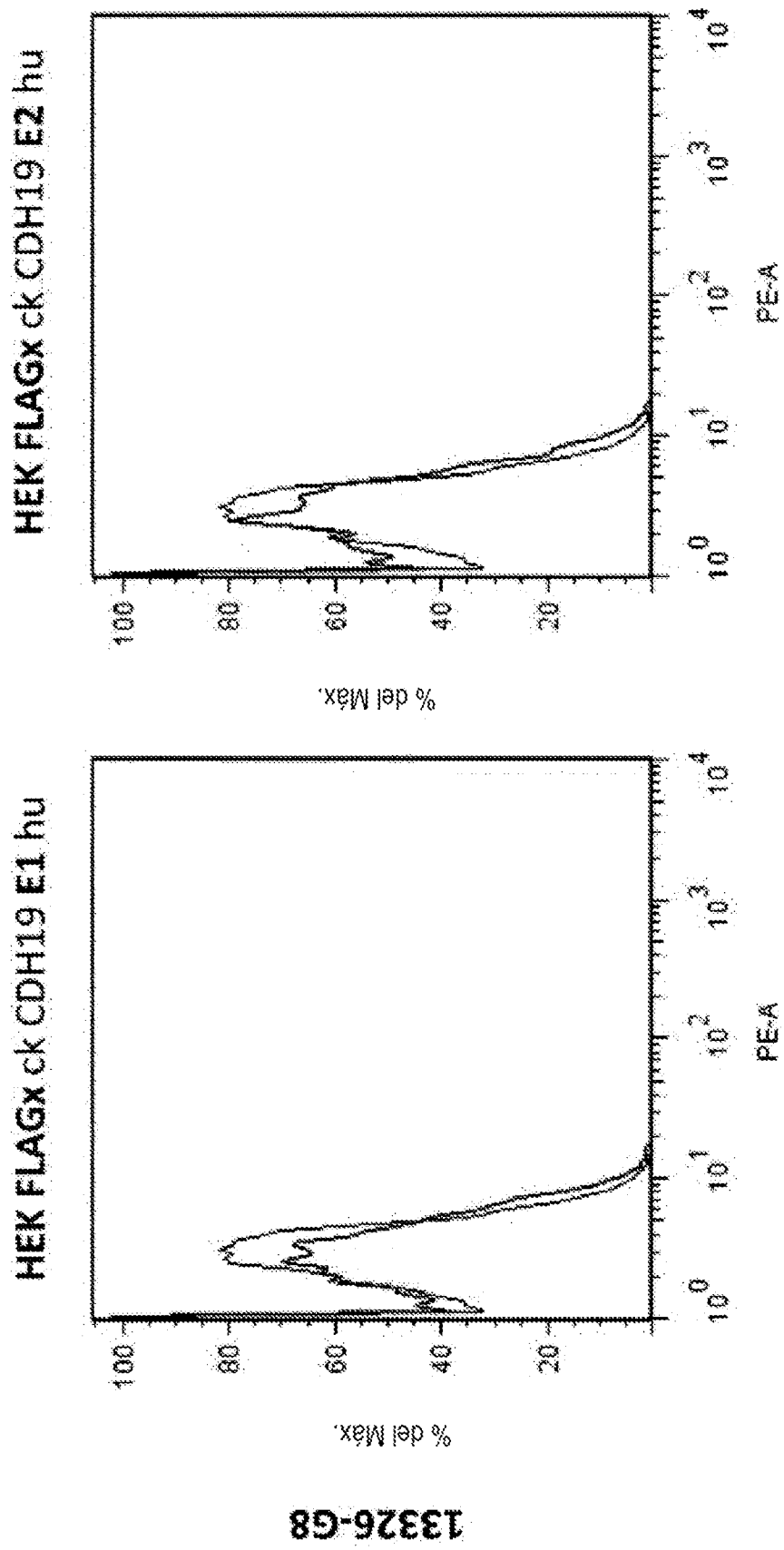


Figura 6 (continuación)

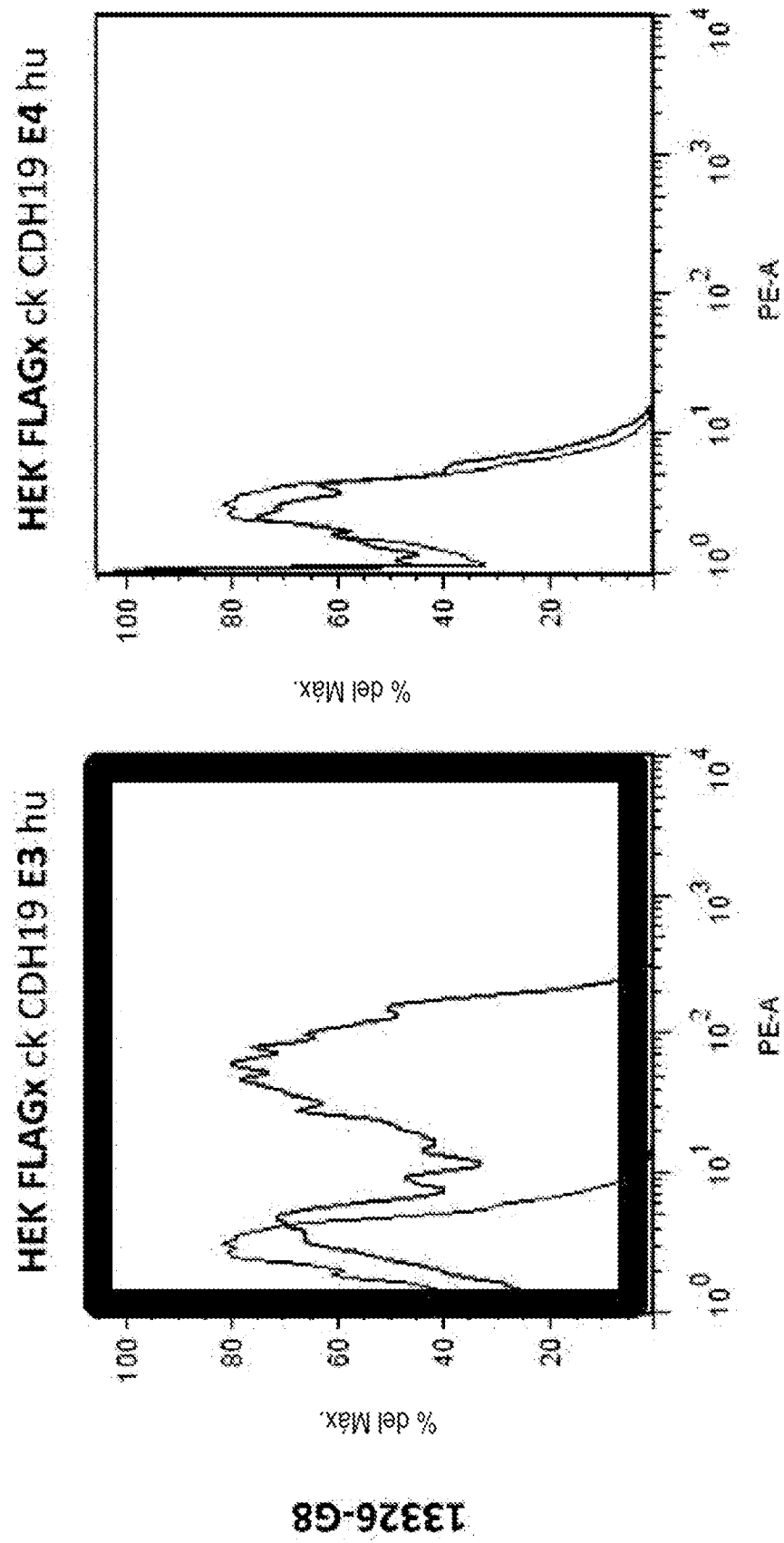


Figura 6 (continuación)

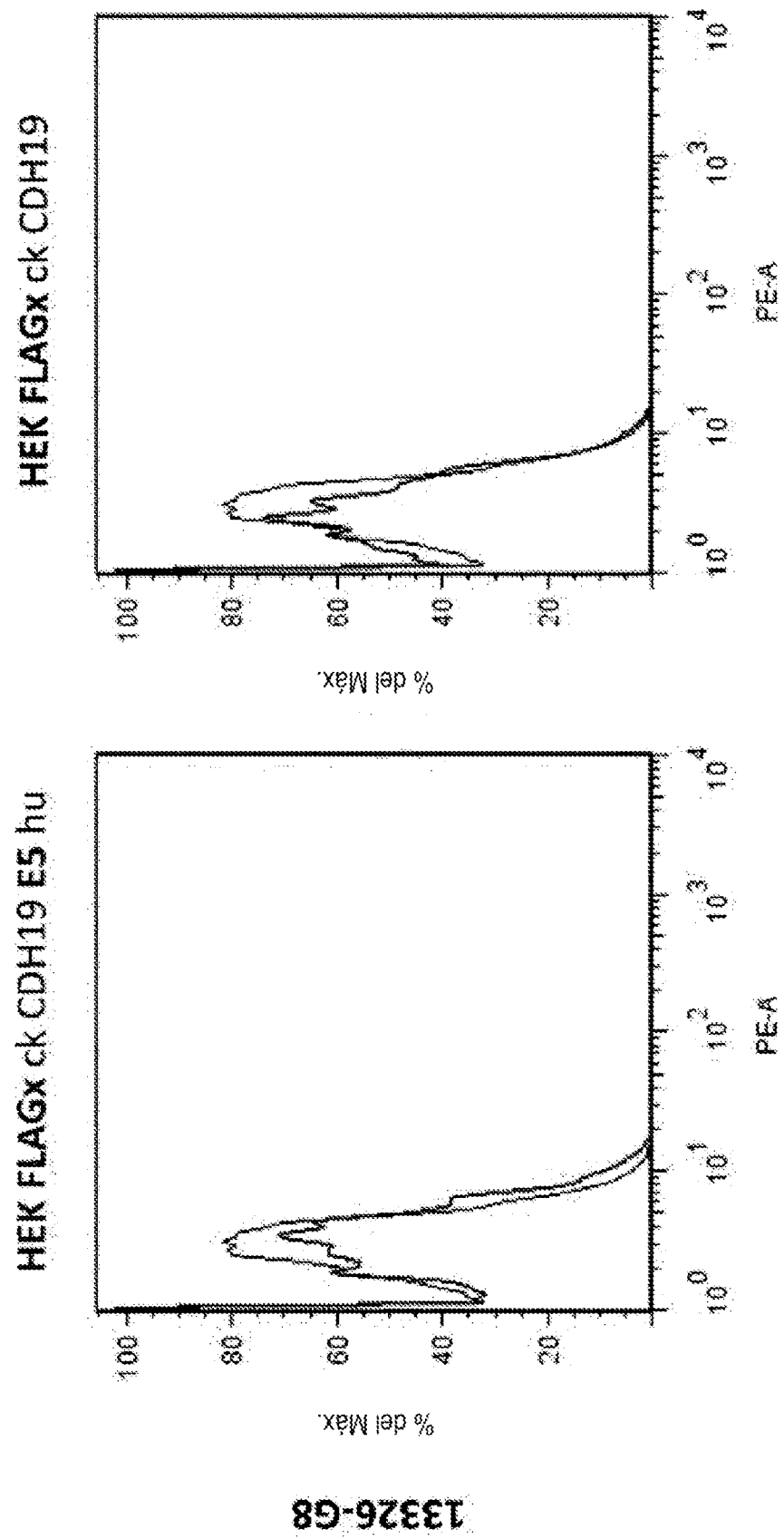


Figura 6 (continuación)

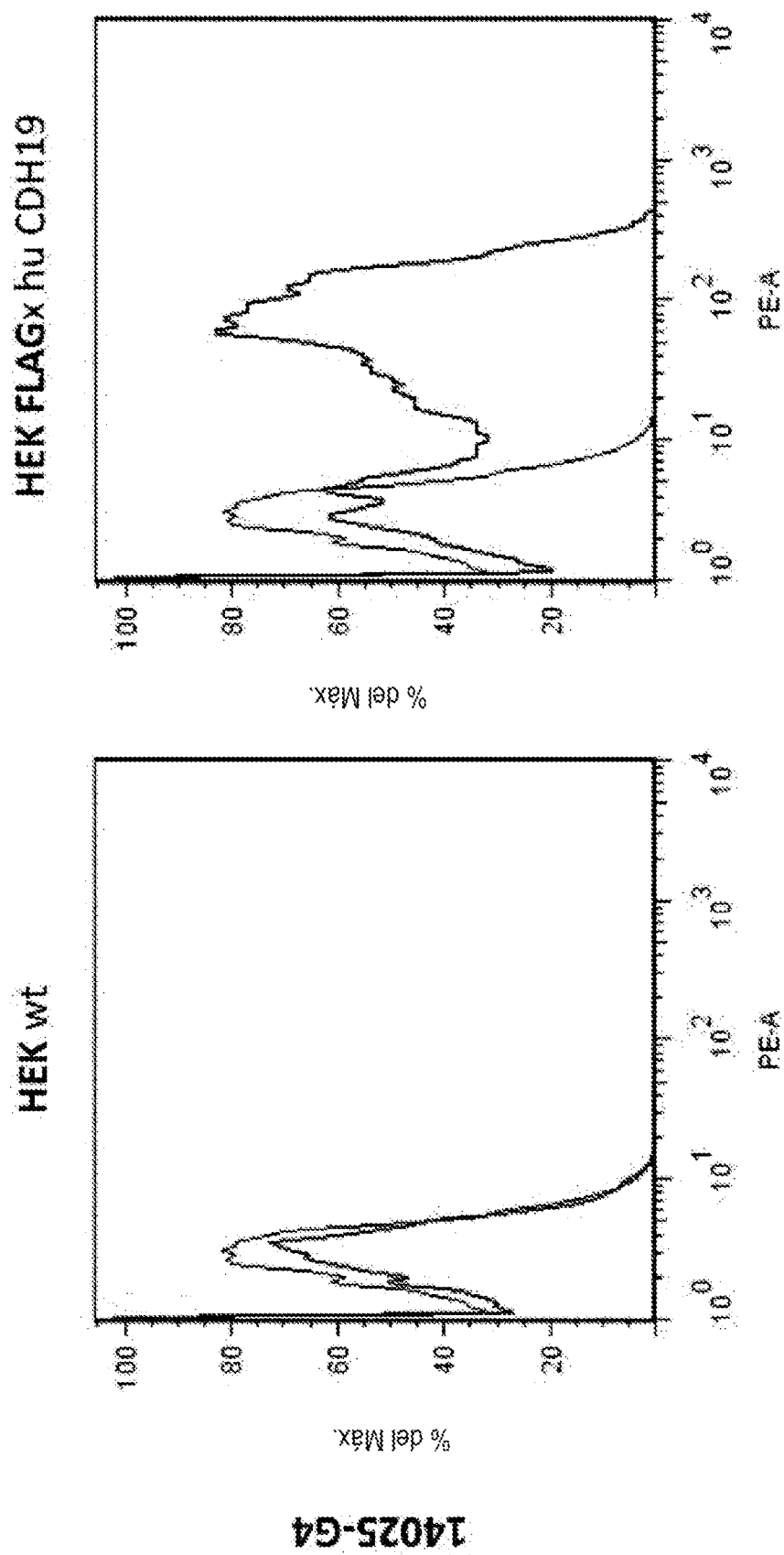


Figura 6 (continuación)

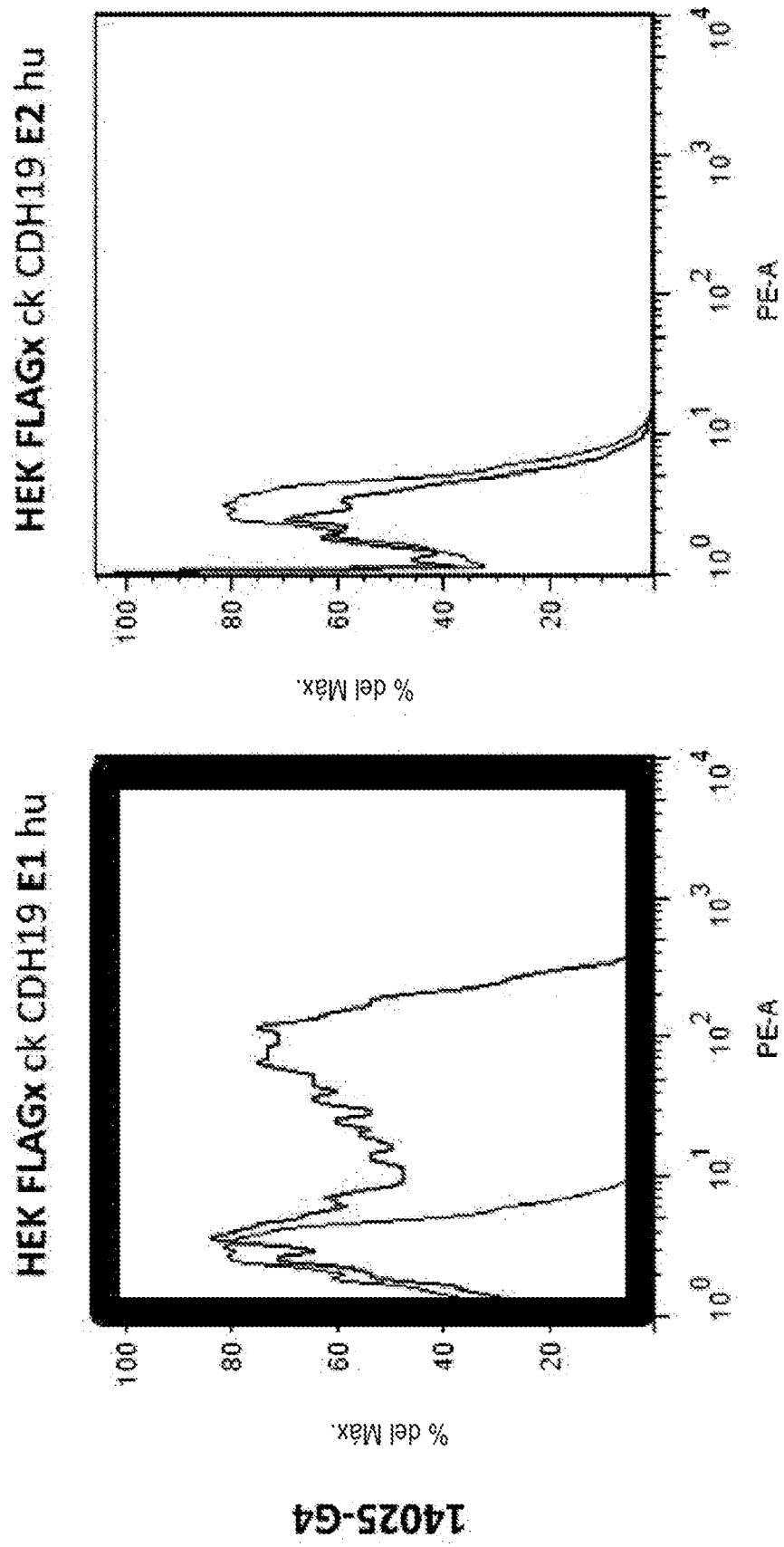


Figura 6 (continuación)

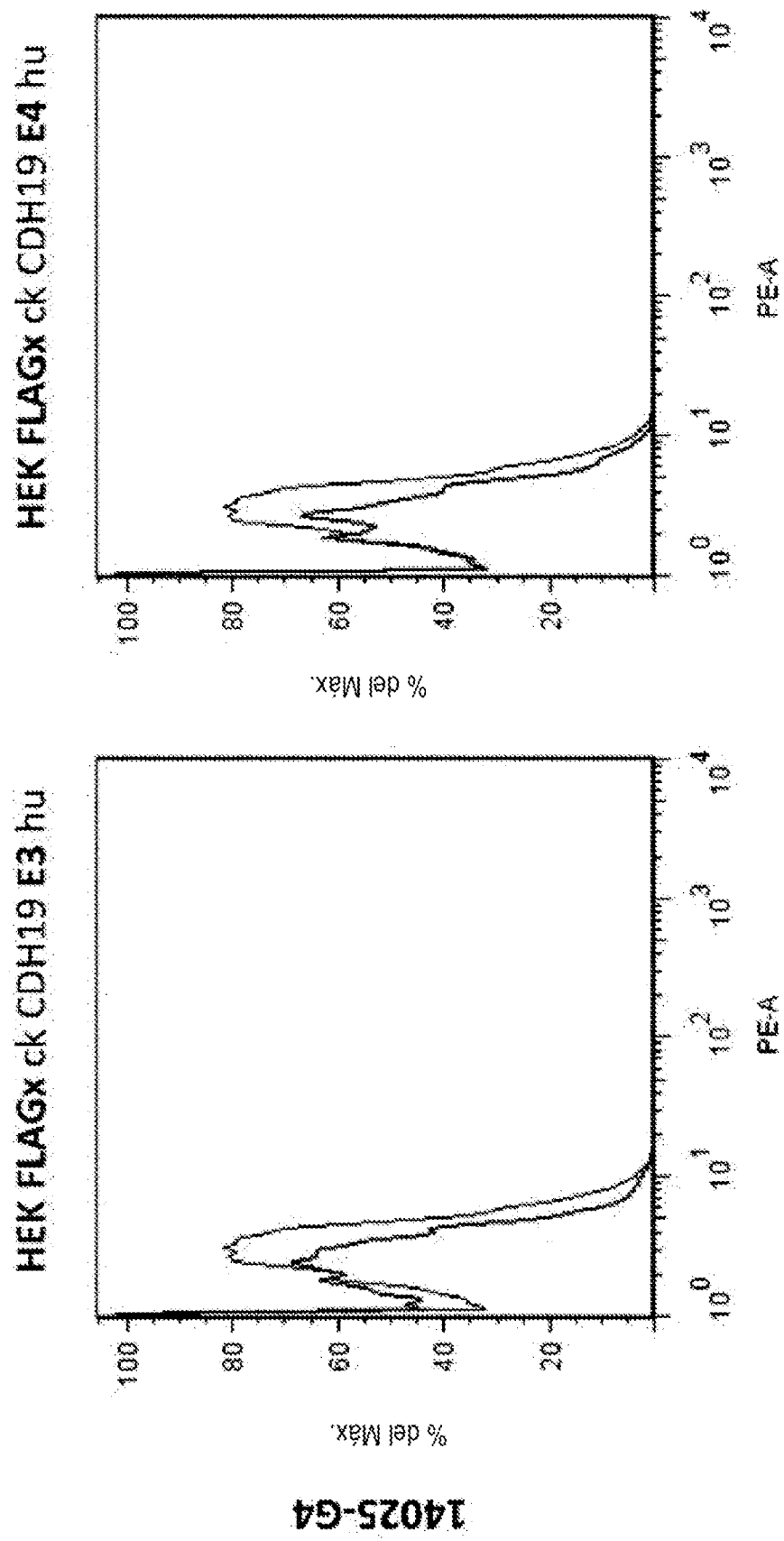


Figura 6 (continuación)

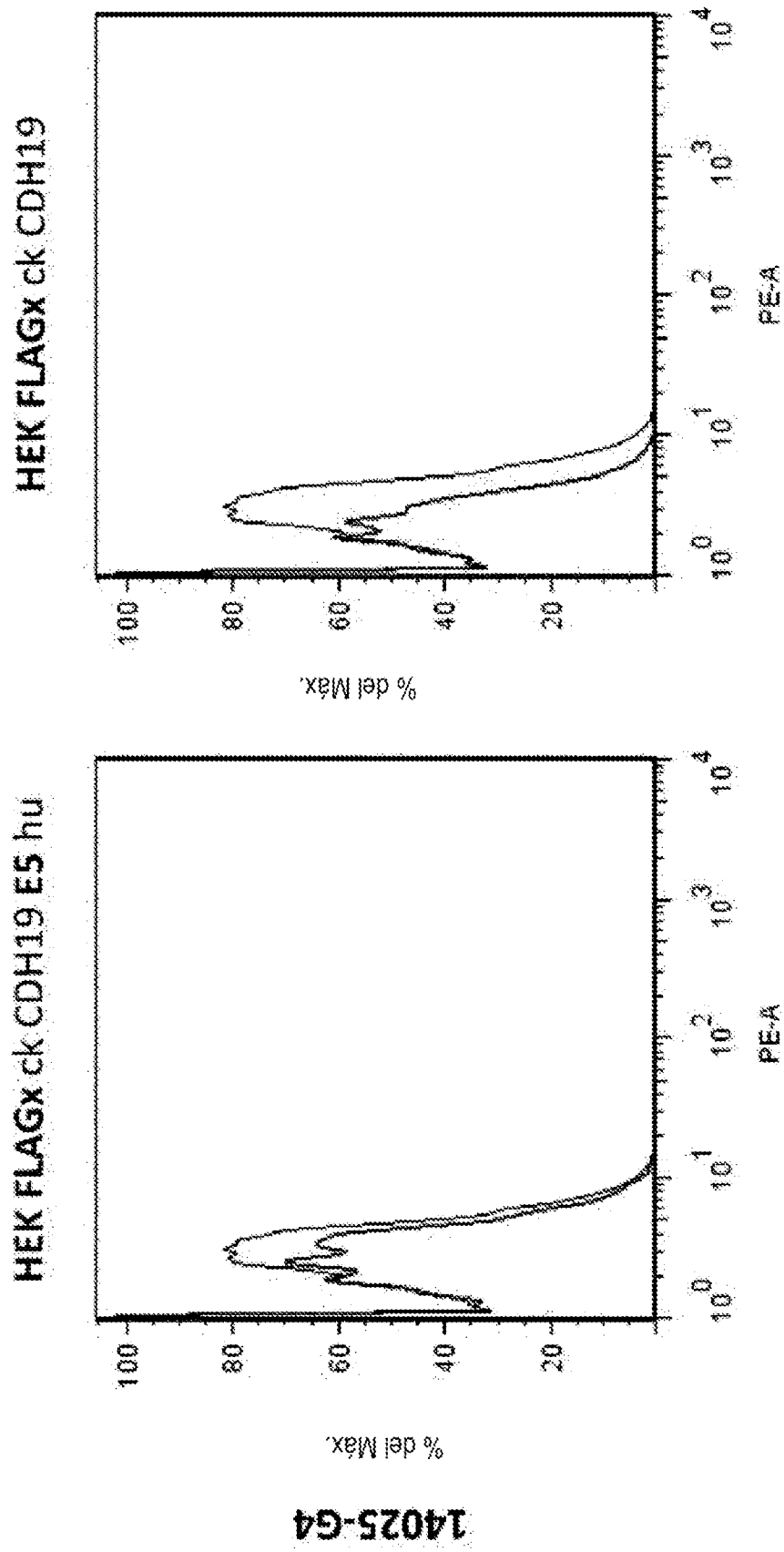


Figura 6 (continuación)

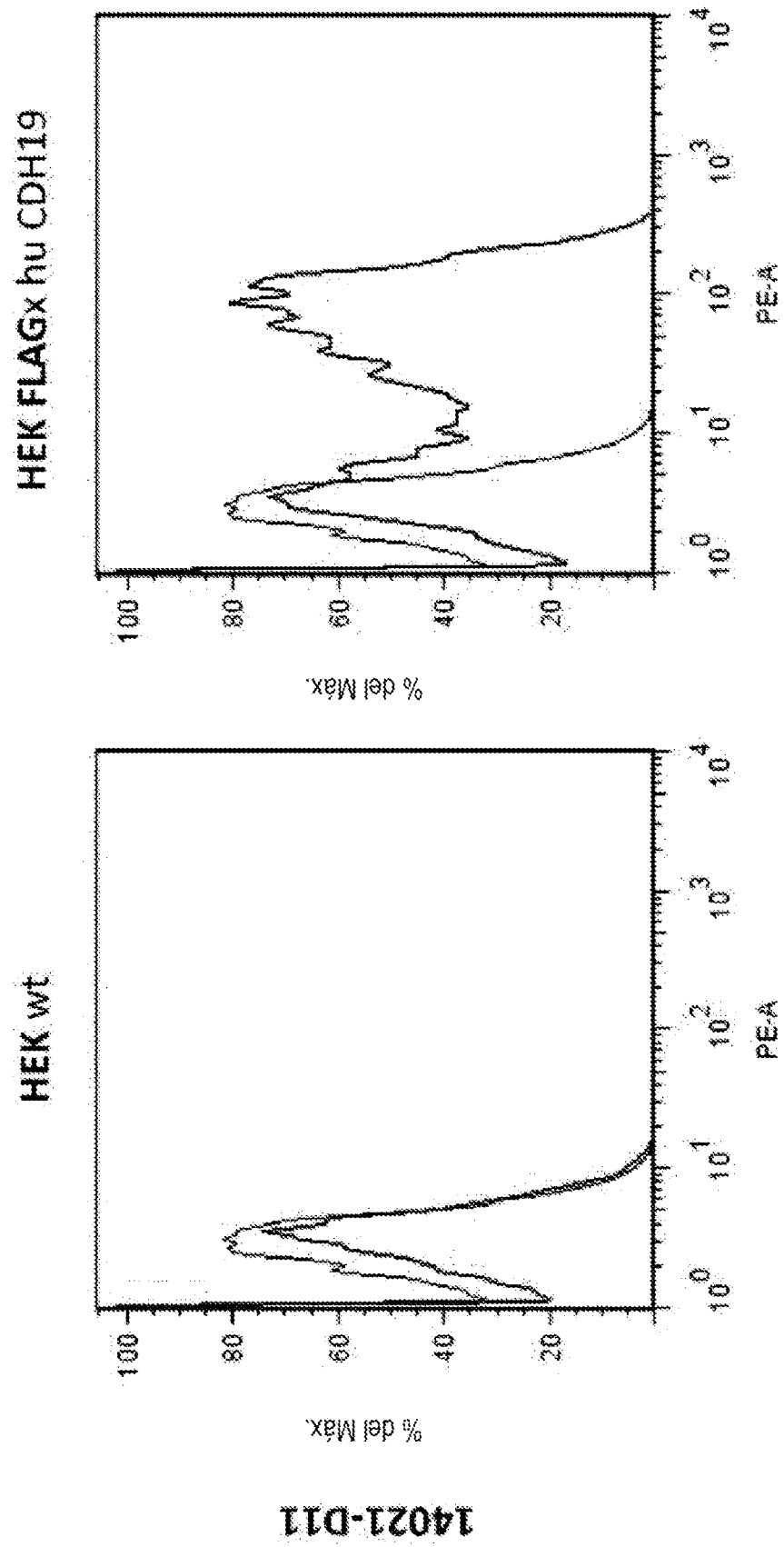


Figura 6 (continuación)

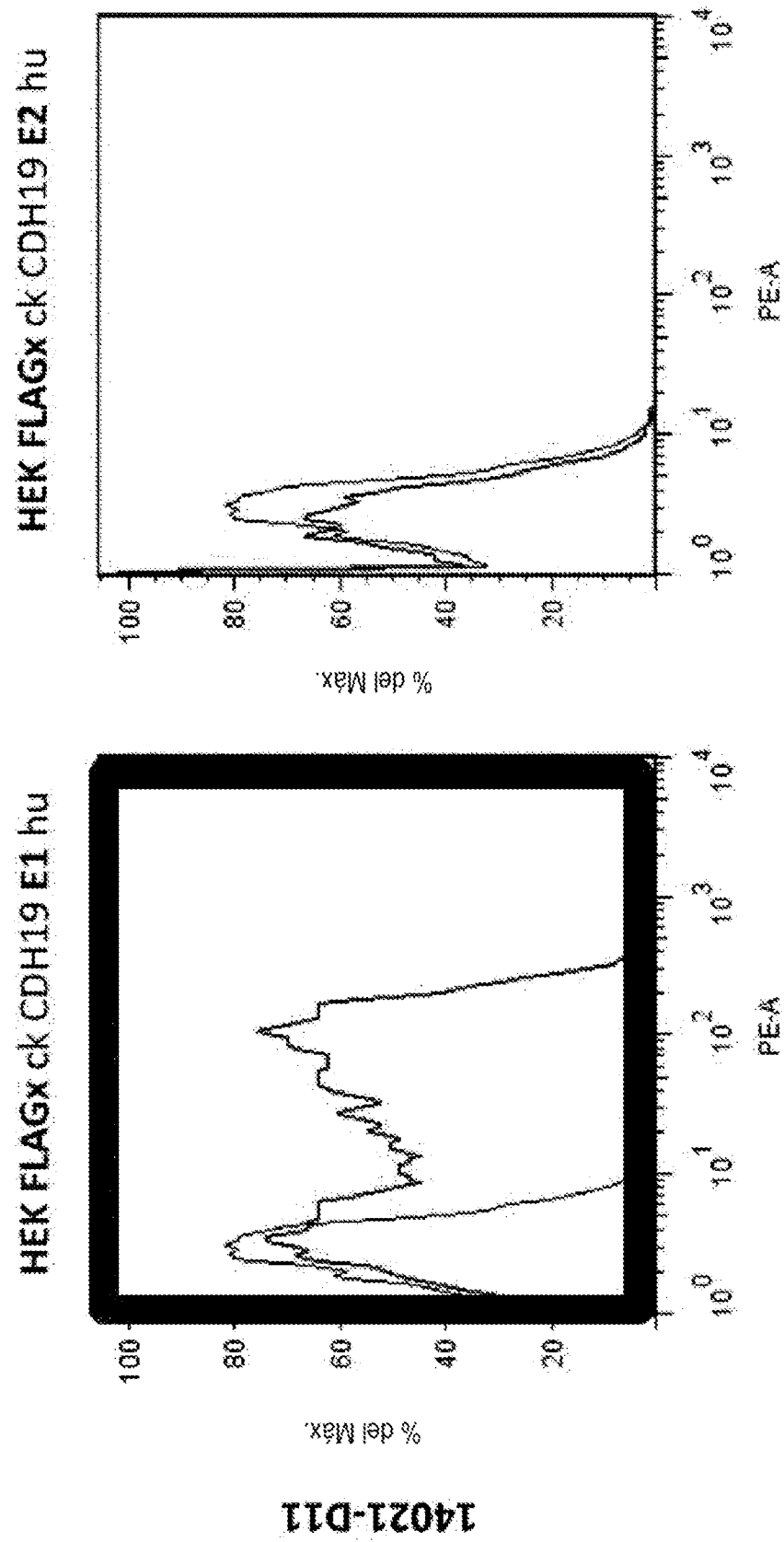


Figura 6 (continuación)

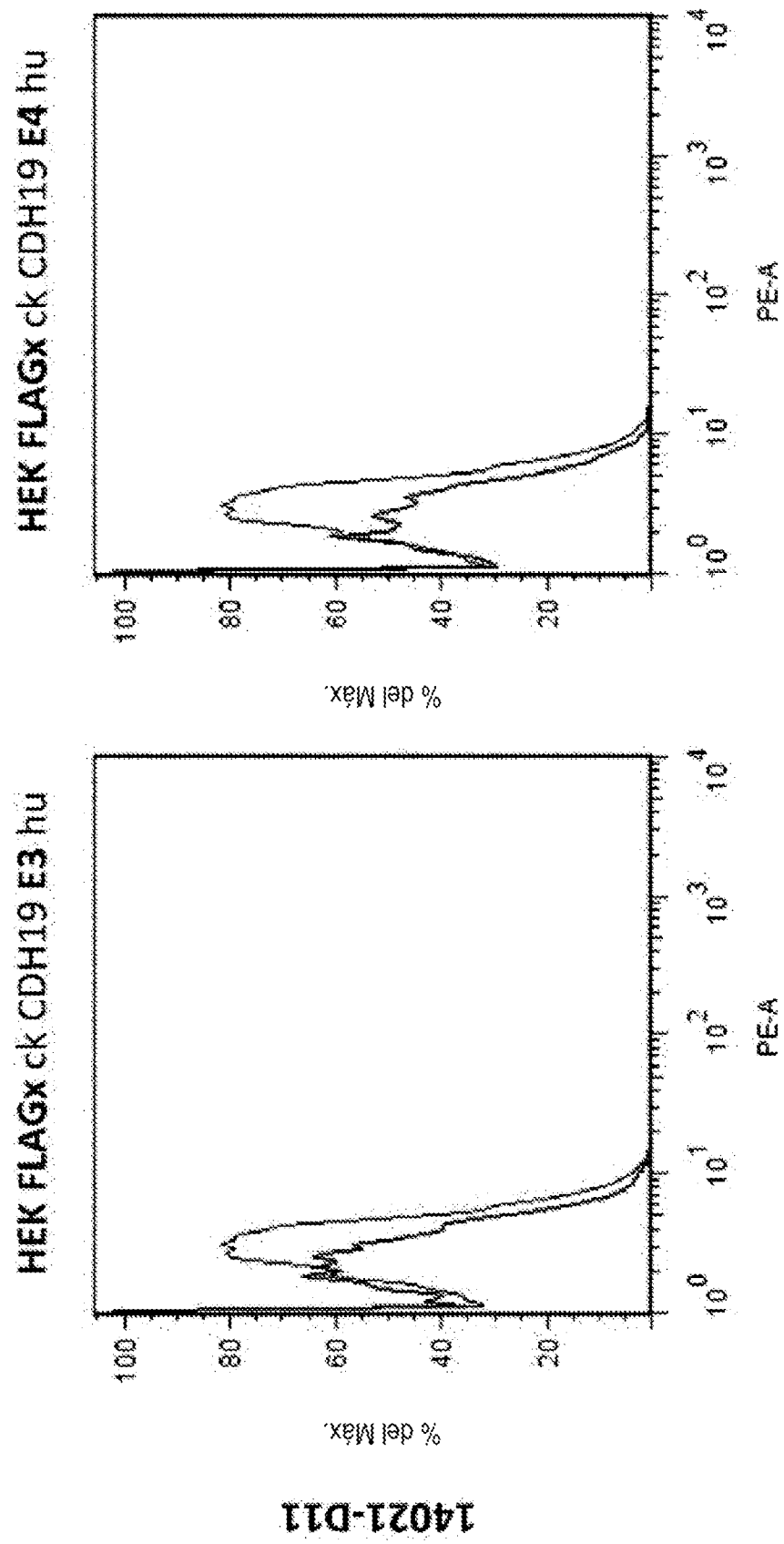


Figura 6 (continuación)

