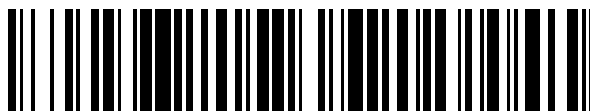


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 848 732**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/64 (2007.01)
A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2013** **E 18187423 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020** **EP 3434695**

54 Título: **Inmunoterapia mejorada**

30 Prioridad:

07.08.2012 EP 12179473

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.08.2021

73 Titular/es:

ROCHE GLYCART AG (100.0%)
Wagistrasse 10
8952 Schlieren, CH

72 Inventor/es:

GERDES, CHRISTIAN;
KLEIN, CHRISTIAN;
NICOLINI, VALERIA G. y
UMANA, PABLO

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 848 732 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

Inmunoterapia mejorada

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a la inmunoterapia. Más en particular, la invención se refiere a inmunoconjugados dirigidos a antígeno y anticuerpos genomanipulados con Fc para su uso combinado como agentes inmunoterápicos. Además, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden combinaciones de dichos inmunoconjugados y anticuerpos y procedimientos de uso de los mismos en el tratamiento de enfermedades.

Antecedentes

La destrucción selectiva de una célula individual o de un tipo de célula específico a menudo es deseable en una variedad de entornos clínicos. Por ejemplo, el objetivo principal del tratamiento del cáncer es destruir específicamente las células tumorales, dejando las células y los tejidos sanos intactos y sin daños.

Una forma atractiva de lograr esto es induciendo una respuesta inmunitaria contra el tumor, para hacer que las células efectoras inmunitarias, tales como los linfocitos citolíticos naturales (NK) o los linfocitos T citotóxicos (CTL), ataquen y destruyan las células tumorales. Las células efectoras se pueden activar mediante diversos estímulos, que incluyen una serie de citocinas que inducen eventos de señalización a través de la unión a sus receptores en la superficie de las células inmunitarias. Por ejemplo, la interleucina-2 (IL-2), que, entre otras cosas, estimula la proliferación y la activación de los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos NK, se ha aprobado para el tratamiento del carcinoma metastásico de células renales y el melanoma maligno. Sin embargo, el aclaramiento rápido de la sangre y la falta de especificidad tumoral requieren la administración sistémica de altas dosis de una citocina a fin de lograr una concentración suficientemente alta de la citocina en el sitio del tumor para activar una respuesta inmunitaria o tener un efecto antitumoral. Estos altos niveles sistémicos de citocina pueden dar lugar a una toxicidad intensa y reacciones adversas, como es el caso también de IL-2. Para su uso en el tratamiento del cáncer, por lo tanto, es deseable administrar específicamente citocinas al tumor o al microentorno tumoral. Esto se puede lograr conjugando la citocina con un resto dirigido, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, específico para un antígeno tumoral. Otra ventaja de dichos inmunoconjugados es su semivida en suero incrementada en comparación con la citocina no conjugada. Su capacidad para maximizar las actividades inmunoestimuladoras en el sitio de un tumor mientras se mantienen los efectos secundarios sistémicos a un mínimo a una dosis más baja hace que los inmunoconjugados de citocinas sean agentes inmunoterápicos óptimos.

Otra forma de activar las células efectoras es a través del acoplamiento de los receptores de Fc activadores en su superficie por la porción Fc de inmunoglobulinas o proteínas de fusión recombinantes que comprenden una región Fc. Las llamadas funciones efectoras de un anticuerpo que están mediadas por su región Fc son un importante mecanismo de acción en la inmunoterapia del cáncer basada en anticuerpos. La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la destrucción de células diana recubiertas de anticuerpos (por ejemplo, células tumorales) por linfocitos NK, se desencadena cuando el anticuerpo unido a la superficie de una célula interactúa con receptores de Fc en el linfocito NK. Los linfocitos NK expresan FcγRIIIa (CD16a) que reconoce las inmunoglobulinas de la subclase IgG₁ o IgG₃. Otras funciones efectoras incluyen la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y varían con la clase y subclase del anticuerpo, dado que diferentes tipos de células inmunitarias portan diferentes conjuntos de receptores de Fc que reconocen diferentes tipos y subtipos de dominios constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, los dominios constantes de la cadena pesada α, δ, γ, ε o μ, correspondientes a los anticuerpos de clase IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, respectivamente). Se han empleado diversas estrategias para incrementar las funciones efectoras de los anticuerpos. Por ejemplo, Shields *et al.* (J Biol Chem 9(2), 6591-6604 (2001)) muestran que las sustituciones aminoácidas en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos) mejoran la unión de anticuerpos al receptor de FcγRIIIa y ADCC. Se describen otras variantes de anticuerpo que tienen modificaciones de aminoácido en la región Fc y que presentan una función efectora y unión al receptor de Fc mejoradas, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.737.056, el documento WO 2004/063351 y el documento WO 2004/099249. De forma alternativa, se puede obtener una unión al receptor de Fc y función efectora incrementadas alterando la glucosilación de un anticuerpo. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos que se usan más comúnmente en la inmunoterapia del cáncer, tienen un sitio de glucosilación unido a N conservado en Asn 297 en cada dominio CH2 de la región Fc. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos a Asn 297 están ocultos entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia es esencial para que el anticuerpo pueda mediar en funciones efectoras, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely *et al.*, Glycobiology 5, 813-822 (1995); Jefferis *et al.*, Immunol Rev 163, 59-76 (1998); Wright y Morrison, Trends Biotechnol 15, 26-32 (1997)). Los estudios de genomanipulación de proteínas han mostrado que los FcγR interactúan con la región bisagra inferior del dominio CH2 de IgG (Lund *et al.*, J Immunol 157, 4963-69 (1996)). Sin embargo, la unión de FcγR también requiere la presencia de los oligosacáridos en la región CH2 (Lund *et al.*, J Immunol 157, 4963-69 (1996); Wright y Morrison, Trends Biotech 15, 26-31 (1997)), lo que sugiere que tanto el oligosacárido como el polipéptido contribuyen directamente al sitio de interacción o bien que se requiere que el oligosacárido mantenga

una conformación de polipéptido CH2 activa. Por lo tanto, se puede explorar la modificación de la estructura del oligosacárido como un medio para incrementar la afinidad de la interacción entre IgG₁ y FcγR, y para incrementar la actividad ADCC de los anticuerpos IgG₁. Umaña *et al.* (Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999) y la patente de EE. UU. n.º 6.602.684 (documento WO 99/54342)) mostraron que la sobreexpresión de β-(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisecados, en células de ovario de hámster chino (CHO) incrementa significativamente la actividad ADCC *in vitro* de los anticuerpos producidos en esas células. La sobreexpresión de GnTIII en líneas de células de producción da lugar a anticuerpos enriquecidos en oligosacáridos bisecados, que en general también son no fucosilados y de tipo híbrido. Si además de GnTIII, se sobreexpresa la manosidasa II (ManII) en líneas de células de producción, se obtienen anticuerpos enriquecidos en oligosacáridos bisecados, no fucosilados del tipo complejo (Ferrara *et al.*, Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006)). Ambos tipos de anticuerpos muestran una ADCC fuertemente incrementada, en comparación con anticuerpos con glucanos no modificados, pero solo los anticuerpos en los que la mayoría de los N-glucanos son del tipo complejo pueden inducir una citotoxicidad dependiente del complemento significativa (Ferrara *et al.*, Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006)). El factor crucial para el incremento de la actividad de ADCC parece ser la eliminación de fucosa del residuo de N-acetilglucosamina más interno del núcleo de oligosacárido, que mejora la unión del dominio Fc de IgG a FcγRIIIa (Shinkawa *et al.*, J Biol Chem 278, 3466-3473 (2003)). Otros procedimientos para producir anticuerpos con fucosilación reducida incluyen, por ejemplo, expresión en células huésped deficientes en α-(1,6)-fucosiltransferasa (Yamane-Ohnuki *et al.*, Biotech Bioeng 87, 614-622 (2004); Niwa *et al.*, J Immunol Methods 306, 151-160 (2006)). El documento WO 2011/001276 A1 se refiere al tratamiento del cáncer usando anticuerpos anti-ErbB, tales como cetuximab o trastuzumab, en combinación con conjugados de anticuerpo-interleucina 2 (IL-2) que se dirigen a tenascina C.

A pesar de los éxitos logrados en la inmunoterapia contra el cáncer mediante el uso de citocinas libres, inmunoconjugados o anticuerpos genomanipulados, existe una necesidad continua de nuevas opciones de tratamiento eficaces y seguras en el tratamiento del cáncer.

Sumario de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto que la combinación de estas dos estrategias para la activación de células inmunitarias locales, es decir, la estimulación simultánea de células efectoras por inmunoconjugados de citocina y por anticuerpos genomanipulados para que tengan funciones efectoras incrementadas, mejora enormemente la eficacia de la inmunoterapia contra el cáncer.

En consecuencia, la presente invención proporciona una combinación, para su uso en el tratamiento del cáncer en un individuo que lo necesite, de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, en la que el primer anticuerpo está dirigido a un antígeno presentado en una célula tumoral o en un entorno de células tumorales, y en la que el resto efector es un resto efector IL-2 mutante que comprende al menos una mutación aminoacídica que reduce o suprime la afinidad del resto efector IL-2 mutante por la subunidad α del receptor de IL-2, pero conserva la afinidad del resto efector IL-2 mutante por el receptor de IL-2 de afinidad intermedia, en comparación con el resto efector IL-2 no mutado, y (b) un segundo anticuerpo seleccionado del grupo de (i) un anticuerpo de clase IgG dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 102 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 103, en la que el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado, y (ii) un anticuerpo de clase IgG dirigido a HER3, que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 142 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 146, en la que el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. El resto efector IL-2 mutante puede comprender tres sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a los residuos 42, 45 y 72 de IL-2 humana (SEQ ID NO: 1). El resto efector IL-2 mutante puede ser IL-2 humana que comprende las sustituciones aminoacídicas F42A, Y45A y L72G. El resto efector IL-2 mutante puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 2. El primer anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa, en particular un anticuerpo de clase IgG, más en particular un anticuerpo de subclase IgG1. El resto efector puede compartir un enlace peptídico amino o carboxiterminal con el primer anticuerpo. El primer anticuerpo se puede genomanipular para que tenga una unión reducida a un receptor de Fc activador, en particular una unión reducida a FcγRIIIa humano. El primer anticuerpo puede comprender una sustitución aminoacídica en la posición P329 de las cadenas pesadas de inmunoglobulina (numeración EU como se describe en Kabat). El primer anticuerpo puede comprender las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración EU como se describe en Kabat) en las cadenas pesadas de inmunoglobulina. El inmunoconjugado puede consistir esencialmente en un resto efector y un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida, en el que el resto efector se fusiona en su aminoácido aminoterminal con el extremo carboxílico de una de las cadenas pesadas del primer anticuerpo, opcionalmente a través de un conector peptídico. El primer anticuerpo se puede dirigir a un antígeno seleccionado del grupo de proteína de activación de fibroblastos (FAP), el dominio A1 de tenascina C (TNC A1), el dominio A2 de tenascina C (TNC A2), el dominio adicional B de fibronectina (EDB), antígeno carcinoembrionario (CEA) y proteoglicano de sulfato de condroitina asociado al melanoma (MCSP). El primer anticuerpo se puede dirigir a FAP y comprende (i) la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 12 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 11; (ii)

la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 16; (iii) la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 47 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 46; (iv) la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 63 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 62; o (v) la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 67 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 66. El primer anticuerpo se puede dirigir a CEA y, si es así, comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 114 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 115. El segundo anticuerpo puede ser un anticuerpo de clase IgG de longitud completa, en particular un anticuerpo de subclase IgG₁. La función efectora se puede seleccionar del grupo de unión a un receptor de Fc activador, ADCC, ADCP, CDC y secreción de citocinas. El segundo anticuerpo se puede genomanipular mediante la introducción de una o más mutaciones aminoacídicas en la región Fc o mediante modificación de la glucosilación en la región Fc. El individuo puede ser un mamífero, en particular un ser humano.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que la composición farmacéutica comprende (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, en la que el primer anticuerpo está dirigido a un antígeno presentado en una célula tumoral o en un entorno de células tumorales, y en la que el resto efector es un resto efector IL-2 mutante que comprende al menos una mutación aminoacídica que reduce o suprime la afinidad del resto efector IL-2 mutante por la subunidad α del receptor de IL-2, pero conserva la afinidad del resto efector IL-2 mutante por el receptor de IL-2 de afinidad intermedia, en comparación con el resto efector IL-2 no mutado, y (b) un segundo anticuerpo seleccionado del grupo de (i) un anticuerpo de clase IgG dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 102 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 103, en la que el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado, y (ii) un anticuerpo de clase IgG dirigido a HER3, que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 142 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 146, en la que el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende en el mismo recipiente o en recipientes separados (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, en el que el primer anticuerpo está dirigido a un antígeno presentado en una célula tumoral o en un entorno de células tumorales, y en el que el resto efector es un resto efector IL-2 mutante que comprende al menos una mutación aminoacídica que reduce o suprime la afinidad del resto efector IL-2 mutante por la subunidad α del receptor de IL-2, pero conserva la afinidad del resto efector IL-2 mutante por el receptor de IL-2 de afinidad intermedia, en comparación con el resto efector IL-2 no mutado; (b) un segundo anticuerpo seleccionado del grupo de (i) un anticuerpo de clase IgG dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 102 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 103, en el que el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado, y (ii) un anticuerpo de clase IgG dirigido a HER3, que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 142 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 146, en el que el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado y (c) opcionalmente un prospecto del envase que comprende instrucciones impresas que indican el uso del tratamiento combinado como procedimiento para tratar el cáncer.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En un modo de realización, el resto efector es una citocina. En un aspecto de la divulgación, la citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-2, GM-CSF, IFN- α e IL-12. En un modo de realización particular, el resto efector es IL-2. En otro aspecto, el resto efector es IL-12. En otro modo de realización particular, el resto efector IL-2 es un resto efector IL-2 mutante que comprende al menos una mutación aminoacídica, en particular una sustitución aminoacídica que reduce o suprime la afinidad del resto efector IL-2 mutante por la subunidad α del receptor de IL-2, pero conserva la afinidad del resto efector IL-2 mutante por el receptor de IL-2 de afinidad intermedia, en comparación con el resto efector IL-2 no mutado. En un modo de realización específico, el resto efector IL-2 mutante comprende una, dos o tres sustituciones aminoacídicas en una, dos o tres posiciones seleccionadas de las posiciones correspondientes al residuo 42, 45 y 72 de IL-2 humana (SEQ ID NO: 1). En un modo de realización más específico, el resto efector IL-2 mutante comprende tres sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes al residuo 42, 45 y 72 de IL-2 humana. En un modo de realización incluso más específico, el resto efector IL-2 mutante es IL-2 humana que comprende las sustituciones aminoacídicas F42A, Y45A y L72G. En determinados modos de realización, el resto efector IL-2 mutante comprende adicionalmente una mutación aminoacídica en una posición correspondiente a la posición 3 de IL-2 humana, que elimina el sitio de O-glucosilación de IL-2. En un modo de realización específico, el resto efector IL-2 mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En un modo de realización, el resto efector es un resto

efector monocatenario.

En un modo de realización, el primer anticuerpo es un anticuerpo de clase IgG de longitud completa, en particular un anticuerpo de subclase IgG₁ de longitud completa. En un modo de realización, el resto efector comparte un enlace peptídico amino o carboxiterminal con el primer anticuerpo. En un modo de realización, el resto efector comparte un enlace peptídico aminoterminal con el primer anticuerpo. En un modo de realización, el resto efector se fusiona en su extremo N con el extremo C de una de las cadenas pesadas del primer anticuerpo. En un modo de realización particular, el inmunoconjugado comprende no más de un resto efector. En un modo de realización, el inmunoconjugado consiste esencialmente en un resto efector y un primer anticuerpo unido por uno o más conectores peptídicos. En un modo de realización específico, el inmunoconjugado comprende un resto efector, en particular un resto efector monocatenario, y un primer anticuerpo, en particular un anticuerpo de clase IgG de longitud completa, en el que el resto efector se fusiona en su aminoácido aminoterminal con el extremo carboxílico de una de las cadenas pesadas del primer anticuerpo, opcionalmente a través de un conector peptídico. En determinados modos de realización, el primer anticuerpo comprende en la región Fc una modificación que promueve la heterodimerización de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina no idénticas. En un modo de realización específico, dicha modificación es una modificación de botón en ojal, que comprende una modificación de botón en una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina y una modificación de ojal en la otra de las dos cadenas pesadas de inmunoglobulina. En un modo de realización, el primer anticuerpo comprende una modificación dentro de la interfase entre las dos cadenas pesadas de inmunoglobulina en el dominio CH3, en el que i) en el dominio CH3 de una cadena pesada, un residuo aminoácido se reemplaza por un residuo aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando de ese modo una protuberancia ("botón") dentro de la interfase en el dominio CH3 de una cadena pesada que se puede posicionar en una cavidad ("ojal") dentro de la interfase en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, y ii) en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, un residuo aminoácido se reemplaza por un residuo aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de ese modo una cavidad ("ojal") dentro de la interfase en el segundo dominio CH3 dentro del que se puede posicionar una protuberancia ("ojal") dentro de la interfase en el primer dominio CH3. En un modo de realización, el primer anticuerpo comprende la sustitución aminoácida T366W y opcionalmente la sustitución aminoácida S354C en una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina, y las sustituciones aminoácidas T366S, L368A, Y407V y, opcionalmente, Y349C en la otra de las cadenas pesadas de inmunoglobulina. En un modo de realización particular, el resto efector se fusiona con el aminoácido amino o carboxiterminal de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la modificación de botón.

En un modo de realización, la función efectora reducida del primer anticuerpo se selecciona del grupo de unión reducida a un receptor de Fc activador, ADCC reducida, ADCP reducida, CDC reducida y secreción de citocinas reducida. En un modo de realización, la función efectora reducida es unión reducida a un receptor de Fc activador. En un modo de realización, el receptor de Fc activador es un receptor humano. En un modo de realización, el receptor de Fc activador es un receptor de Fcγ. En un modo de realización específico, el receptor de Fc activador se selecciona del grupo de FcγRIIIa, FcγRI y FcγRIIa. En un modo de realización, el receptor de Fc activador es FcγRIIIa, en particular FcγRIIIa humano. En un modo de realización, la función efectora reducida es una ADCC reducida. En un modo de realización, la función efectora reducida es unión reducida a un receptor de Fc activador y ADCC reducida.

En un modo de realización, el primer anticuerpo se genomanipula mediante la introducción de una o más mutaciones aminoácidas en la región Fc. En un modo de realización específico, las mutaciones aminoácidas son sustituciones aminoácidas. En un modo de realización específico, el primer anticuerpo, en particular un anticuerpo de subclase IgG₁ humana de longitud completa, comprende una sustitución aminoácida en la posición P329 de las cadenas pesadas de inmunoglobulina (numeración de Kabat). En un modo de realización más específico, la sustitución aminoácida es P329A o P329G, en particular, P329G. En un modo de realización, el anticuerpo comprende otra sustitución aminoácida en una posición seleccionada de S228, E233, L234, L235, N297 y P331 de las cadenas pesadas de inmunoglobulina. En un modo de realización más específico, la otra sustitución aminoácida es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En un modo de realización particular, el anticuerpo comprende sustituciones aminoácidas en las posiciones P329, L234 y L235 de las cadenas pesadas de inmunoglobulina (numeración de Kabat). En un modo de realización más particular, el anticuerpo comprende las sustituciones aminoácidas L234A, L235A y P329G (LALA P329G) en las cadenas pesadas de inmunoglobulina.

En determinados modos de realización, el primer anticuerpo se dirige a un antígeno presentado en una célula tumoral o en un entorno de células tumorales. En un modo de realización específica, el primer anticuerpo se dirige a un antígeno seleccionado del grupo de proteína de activación de fibroblastos (FAP), el dominio A1 de tenascina C (TNC A1), el dominio A2 de tenascina C (TNC A2), el dominio adicional B de fibronectina (EDB), antígeno carcinoembrionario (CEA) y proteoglicano de sulfato de condroitina asociado al melanoma (MCSP). En un modo de realización particular, el primer anticuerpo se dirige a CEA. En otro modo de realización particular, el primer anticuerpo se dirige a FAP.

En un modo de realización, la función efectora incrementada del segundo anticuerpo se selecciona del grupo de unión incrementada a un receptor de Fc activador, ADCC incrementada, ADCP incrementada, CDC incrementada y

secreción de citocinas incrementada. En un modo de realización, la función efectora incrementada es unión incrementada a un receptor de Fc activador. En un modo de realización específico, el receptor de Fc activador se selecciona del grupo de FcγRIIIa, FcγRI y FcγRIIa. En un modo de realización, el receptor de Fc activador es FcγRIIIa. En un modo de realización, la función efectora incrementada es una ADCC incrementada. En un modo de realización, la función efectora incrementada es unión incrementada a un receptor de Fc activador y ADCC incrementada.

En un modo de realización, el segundo anticuerpo se genomanipula mediante la introducción de una o más mutaciones aminoacídicas en la región Fc. En un modo de realización específico, las mutaciones aminoacídicas son sustituciones aminoacídicas. En un modo de realización, el segundo anticuerpo se genomanipula mediante modificación de la glucosilación en la región Fc. En un modo de realización específico, la modificación de la glucosilación en la región Fc es una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc, en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. En un modo de realización incluso más específico, la proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc es al menos un 20 %, preferentemente al menos un 50 %, lo más preferentemente al menos un 70 % de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc. En otro modo de realización específico, la modificación de la glucosilación en la región Fc es una proporción incrementada de oligosacáridos bisecados en la región Fc, en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. En un modo de realización incluso más específico, la proporción incrementada de oligosacáridos bisecados en la región Fc es al menos aproximadamente un 20 %, preferentemente al menos un 50 %, y lo más preferentemente al menos un 70 % de oligosacáridos bisecados en la región Fc. En aún otro modo de realización específico, la modificación de la glucosilación en la región Fc es una proporción incrementada de oligosacáridos bisecados, no fucosilados en la región Fc, en comparación con un anticuerpo no manipulado. Preferentemente, el segundo anticuerpo tiene al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 35 %, o al menos aproximadamente un 50 % de oligosacáridos bisecados, no fucosilados en la región Fc. En un modo de realización particular, el segundo anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. Una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc de un anticuerpo da como resultado que el anticuerpo tenga una función efectora incrementada, en particular una ADCC incrementada. En un modo de realización particular, los oligosacáridos no fucosilados son oligosacáridos bisecados, no fucosilados.

En un modo de realización, el segundo anticuerpo es un anticuerpo de clase IgG de longitud completa, en particular un anticuerpo de la subclase IgG₁ de longitud completa. En determinados modos de realización, el segundo anticuerpo se dirige a un antígeno presentado en una célula tumoral. En un aspecto, el segundo anticuerpo se dirige a un antígeno seleccionado del grupo de CD20, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), HER2, HER3, receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R), c-Met, proteína 1 que contiene el dominio CUB (CDCP1), antígeno carcinoembrionario (CEA) y proteoglicano de sulfato de condroitina asociado al melanoma (MCSP).

En un modo de realización particular, el segundo anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20 genomanipulado para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. Los anticuerpos anti-CD20 adecuados se describen en el documento WO 2005/044859. En otro modo de realización particular, el segundo anticuerpo es un anticuerpo anti-EGFR genomanipulado para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. Los anticuerpos anti-EGFR adecuados se describen en los documentos WO 2006/082515 y WO 2008/017963. En otro modo de realización particular, el segundo anticuerpo es un anticuerpo anti-IGF-1R genomanipulado para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. Los anticuerpos anti-IGF-1R adecuados se describen en el documento WO 2008/077546. En aún otro modo de realización particular, el segundo anticuerpo es un anticuerpo anti-CEA genomanipulado para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. Los anticuerpos anti-CEA adecuados se describen en la publicación de PCT número WO 2011/023787. En aún otro modo de realización particular, el segundo anticuerpo es un anticuerpo anti-HER3 genomanipulado para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. Los anticuerpos anti-HER3 adecuados se describen en la publicación de PCT número WO 2011/076683. En aún otro modo de realización particular, el segundo anticuerpo es un anticuerpo anti-CDCP1 genomanipulado para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. Los anticuerpos anti-CDCP1 adecuados se describen en la publicación de PCT número WO 2011/023389. En un modo de realización, el segundo anticuerpo se genomanipula para que tenga glucosilación modificada en la región Fc, en comparación con un anticuerpo no genomanipulado, produciendo el anticuerpo en una célula huésped que tiene actividad alterada de una o más glucosiltransferasas.

En un modo de realización, el segundo anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc, en comparación con un anticuerpo no genomanipulado, produciendo el anticuerpo en una célula huésped que tiene actividad β-(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII) incrementada. En un modo de realización particular, la célula huésped tiene adicionalmente actividad α-manosidasa II (ManII) incrementada. En otro modo de realización, el segundo anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc, en comparación con un anticuerpo no

genomanipulado, produciendo el anticuerpo en una célula huésped que tiene actividad α -(1,6)-fucosiltransferasa disminuida.

En un modo de realización, la enfermedad es un trastorno tratable mediante estimulación de la función de células efectoras. En un modo de realización, la enfermedad es un trastorno de proliferación celular. En un modo de realización particular, la enfermedad es cáncer. En un aspecto específico, el cáncer se selecciona del grupo de cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia y cáncer de piel. En un modo de realización, el individuo es un mamífero. En un modo de realización particular, el individuo es un ser humano.

En un modo de realización particular, la divulgación proporciona una combinación de

(a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo de clase IgG de longitud completa genomanipulado para que tenga una función efectora reducida mediante la introducción de una o más mutaciones aminoácidas en la región Fc y una citocina, en el que el resto efector se fusiona en su aminoácido aminoterminal con el extremo carboxílico de una de las cadenas pesadas del primer anticuerpo, opcionalmente a través de un conector peptídico, y

(b) un segundo anticuerpo de clase IgG de longitud completa genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada mediante modificación de la glucosilación en la región Fc, para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La divulgación también engloba el uso de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un individuo.

La divulgación proporciona además un procedimiento de tratamiento de una enfermedad en un individuo, que comprende administrar al individuo una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

También se proporciona por la divulgación un procedimiento de estimulación de la función de células efectoras en un individuo, que comprende administrar al individuo una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, en una cantidad eficaz para estimular la función de las células efectoras.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un kit destinado al tratamiento de una enfermedad, que comprende en el mismo recipiente o en recipientes separados (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, y (c) opcionalmente un prospecto del envase que comprende instrucciones impresas que indican el uso del tratamiento combinado como un procedimiento para tratar la enfermedad.

Se entiende que el inmunoconjugado y el segundo anticuerpo usados en la composición farmacéutica, uso, procedimientos y kit de acuerdo con la invención pueden incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, descritos en los párrafos precedentes en relación con los segundos anticuerpos e inmunoconjugados útiles para la invención.

Breve descripción de los dibujos

FIGURA 1. El inmunoconjugado IgG-IL-2 28H1 dirigido a FAP (A) o el inmunoconjugado IgG-IL-2 DP47GS no dirigido (B), que comprende la IL-2 mutante cuádruple (qm) que carece de unión a CD25, y el GlycoMab anti-EGFR se sometieron a prueba en la línea celular de carcinoma de cabeza y cuello humana FaDu, inyectada por vía intralingual en ratones SCID. Los datos muestran que la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm 28H1, pero no el inmunoconjugado IgG-IL2 qm DP47GS, y el GlycoMab anti-EGFR media una eficacia superior en términos de la mediana de supervivencia potenciada en comparación con el inmunoconjugado respectivo o el GlycoMab anti-EGFR solo (véase el ejemplo 1).

FIGURA 2. Destrucción global de células tumorales A549 por los PBMC (E:T = 10:1, 4 horas), pretratados o no con inmunoconjugado IgG-IL2 qm 28H1 dirigido a FAP o IL-2 (Proleukin) 0,57 nM (A) o 5,7 nM (B), en presencia de diferentes concentraciones de GlycoMab anti-EGFR (véase el ejemplo 2).

FIGURA 3. El inmunoconjugado IgG-IL-2 CH1A1A dirigido a CEA que comprende la IL-2 mutante cuádruple (qm) que carece de unión a CD25, y el GlycoMab anti-EGFR (A) o cetuximab (B) se sometieron a prueba en la línea celular de carcinoma colorrectal humana LS174T, inyectada por vía intraesplénica en ratones SCID transgénicos para FcγRIII. Los datos muestran que la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y el GlycoMab anti-EGFR media una eficacia superior en términos de la mediana de supervivencia y supervivencia global potenciada en comparación con el inmunoconjugado respectivo, el GlycoMab anti-EGFR o cetuximab solo, así como la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y cetuximab (véase el ejemplo 3).

FIGURA 4. El inmunoconjugado IgG-IL-2 CH1A1A dirigido a CEA que comprende la IL-2 mutante cuádruple (qm) que carece de unión a CD25, y el GlycoMab anti-EGFR (A) o cetuximab (B) se sometieron a prueba en la línea celular de carcinoma de pulmón humana A549, inyectada por vía intravenosa en ratones SCID transgénicos para FcγRIII. Los datos muestran que la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y el GlycoMab anti-EGFR media una eficacia superior en términos de la mediana de supervivencia y supervivencia global potenciada en comparación con el inmunoconjugado respectivo o el GlycoMab anti-EGFR solo, así como la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y cetuximab (véase el ejemplo 4).

FIGURA 5. El inmunoconjugado IgG-IL-2 CH1A1A dirigido a CEA que comprende la IL-2 mutante cuádruple (qm) que carece de unión a CD25, y el GlycoMab anti-Her3 se sometieron a prueba en la línea celular de carcinoma colorrectal humana LS174T, inyectados por vía intraesplénica en ratones SCID transgénicos para FcγRIII. Los datos muestran que la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y el GlycoMab anti-Her3 media una eficacia superior en términos de la mediana de supervivencia potenciada en comparación con el inmunoconjugado respectivo o el GlycoMab anti-Her3 solo (véase el ejemplo 5).

FIGURA 6. El inmunoconjugado IgG-IL-2 28H1 dirigido a FAP que comprende la IL-2 mutante cuádruple (qm) que carece de unión a CD25, y el GlycoMab anti-EGFR se sometieron a prueba en la línea celular de carcinoma renal humana ACHN, inyectada por vía intrarrenal en ratones SCID transgénicos para FcγRIII. Los datos muestran que la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y el GlycoMab anti-EGFR media una eficacia superior en términos de la mediana de supervivencia y supervivencia global potenciada en comparación con el GlycoMab anti-EGFR solo, o el GlycoMab anti-EGFR en combinación con Proleukin® (véase el ejemplo 6).

FIGURA 7. Destrucción global de células LS174T por los PBMC tras el tratamiento con GlycoMab anti-Her3 solo (panel izquierdo), el inmunoconjugado IgG-IL-2 qm CH1A1A solo (panel derecho) o la combinación del inmunoconjugado IgG-IL-2 qm CH1A1A con el GlycoMab anti-Her3 (panel derecho).

FIGURA 8. Expresión de CD25 (A) o CD69 (B) en linfocitos NK tras el tratamiento con GlycoMab anti-Her3 solo (panel izquierdo), el inmunoconjugado IgG-IL-2 qm CH1A1A solo (panel derecho) o la combinación del inmunoconjugado IgG-IL-2 qm CH1A1A con el GlycoMab anti-Her3 (panel derecho).

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la divulgación proporciona una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite.

La divulgación proporciona además un procedimiento de tratamiento de una enfermedad en un individuo, que comprende administrar al individuo una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

También se proporciona por la divulgación un procedimiento de estimulación de la función de células efectoras en un individuo, que comprende administrar al individuo una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, en una cantidad eficaz para estimular la función de las células efectoras.

Definiciones

Los términos se usan en el presente documento como se usan en general en la técnica, a menos que se defina de otro modo a continuación.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoconjugado" se refiere a una molécula polipeptídica que incluye al menos un resto efector y un anticuerpo. En determinados modos de realización, el inmunoconjugado comprende no más de un resto efector. Los inmunoconjugados particulares de acuerdo con la invención consisten esencialmente en un resto efector y un anticuerpo unido por uno o más conectores peptídicos. Los inmunoconjugados particulares de acuerdo con la invención son proteínas de fusión, es decir, los componentes del inmunoconjugado están unidos por enlaces peptídicos.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo de control" se refiere a un anticuerpo como existiría libre de restos efectores. Por ejemplo, cuando se compara un inmunoconjugado IgG-IL2 como se describe en el presente documento con un anticuerpo de control, el anticuerpo de control es IgG libre, en el que el inmunoconjugado IgG-IL2 y la molécula de IgG libre se pueden unir específicamente al mismo determinante antigénico.

Como se usa en el presente documento, el término "determinante antigénico" es sinónimo de "antígeno" y "epítipo" y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional compuesta por diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une un anticuerpo, formando un complejo de anticuerpo-antígeno. Se pueden encontrar determinantes antigénicos útiles, por ejemplo, en las superficies de células tumorales, en las superficies de células infectadas por virus, en las superficies de otras células enfermas, libres en el suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (MEC).

Por "se une específicamente" se quiere decir que la unión es selectiva para el antígeno y se puede discriminar de interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de un anticuerpo para unirse a un determinante antigénico específico se puede medir a través de un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas familiares para un experto en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (analizada en un instrumento BIAcore) (Liljeblad *et al.*, Glyco J17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)).

Los términos "anticuerpo anti-[antígeno]" y "un anticuerpo que se une a [antígeno]" se refieren a un anticuerpo que se puede unir al antígeno respectivo con una afinidad suficiente de manera que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse contra el antígeno. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-[antígeno] a una proteína no relacionada es inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo al antígeno medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une a [antígeno] tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

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

De acuerdo con un modo de realización, K_D se mide por resonancia de plasmón superficial usando un aparato BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C con el ligando (por ejemplo, receptor del resto efector, receptor de Fc o antígeno diana) inmovilizado en chips CM5. En resumen, se activan chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el ligando recombinante con acetato de sodio 10 mM, pH 5,5, a 0,5-30 $\mu\text{g/ml}$ antes de la inyección a una caudal de 10 $\mu\text{l/min}$ para lograr aproximadamente 100-5000 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del ligando, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para mediciones cinéticas, diluciones en serie de tres a cinco veces del inmunoconjugado (intervalo entre $\sim 0,01 \text{ nM}$ a 300 nM) se inyectan en HBS-EP+ (GE Healthcare, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4) a 25 °C a una caudal de aproximadamente 30-50 $\mu\text{l/min}$. Se calculan las velocidades de asociación (k_{as}) y velocidades de disociación (k_{dis}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (programa informático de evaluación de BIACORE® T100 versión 1.1.1) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. Se calcula la constante de disociación en equilibrio (K_D) como la proporción $k_{\text{dis}}/k_{\text{as}}$. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

"Unión reducida", por ejemplo unión reducida a un receptor de Fc o a CD25, se refiere a una disminución en la afinidad para la interacción respectiva, como se mide por ejemplo por SPR. Por claridad, el término incluye también la reducción de la afinidad hasta cero (o por debajo del límite de detección del procedimiento analítico), es decir, la

supresión completa de la interacción. A la inversa, "unión incrementada" se refiere a un incremento en la afinidad de unión para la interacción respectiva.

Como se usa en el presente documento, los términos "primero" y "segundo" con respecto a los anticuerpos, restos efectoros, etc., se usan por conveniencia para distinguir cuando hay más de uno de cada tipo de resto. El uso de estos términos no pretende conferir un orden u orientación específica del inmunoconjugado a menos que así se establezca explícitamente.

Como se usa en el presente documento, el término "resto efector" se refiere a un polipéptido, por ejemplo, una proteína o glucoproteína, que influye en la actividad celular, por ejemplo, a través de la transducción de señales u otras vías celulares. En consecuencia, el resto efector de la invención se puede asociar a la señalización mediada por receptor que transmite una señal desde el exterior de la membrana celular para modular una respuesta en una célula que porta uno o más receptores para el resto efector. En un modo de realización, un resto efector puede provocar una respuesta citotóxica en células que portan uno o más receptores para el resto efector. En otro modo de realización, un resto efector puede provocar una respuesta proliferativa en células que portan uno o más receptores para el resto efector. En otro modo de realización, un resto efector puede provocar la diferenciación en células que portan receptores para el resto efector. En otro modo de realización, un resto efector puede alterar la expresión (es decir, regular por incremento o regular por disminución) de una proteína celular endógena en células que portan receptores para el resto efector. Los ejemplos no limitantes de restos efectoros incluyen citocinas, factores de crecimiento, hormonas, enzimas, sustratos y cofactores. El resto efector se puede asociar con un anticuerpo en una variedad de configuraciones para formar un inmunoconjugado.

Como se usa en el presente documento, el término "citocina" se refiere a una molécula que media y/o regula una función o proceso biológico o celular (por ejemplo, inmunidad, inflamación y hematopoyesis). El término "citocina" como se usa en el presente documento incluye "linfocinas", "quimioquinas", "monocinas" e "interleucinas". Los ejemplos de citocinas útiles incluyen, pero no se limitan a, GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TGF- β , TNF- α y TNF- β . Las citocinas particulares son IL-2 e IL-12. El término "citocina", como se usa en el presente documento, también incluye variantes de citocinas que comprenden una o más mutaciones aminoacídicas en las secuencias de aminoácidos de la correspondiente citocina natural, tal como, por ejemplo, las variantes de IL-2 descritas en Sauvé *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 88, 4636-40 (1991); Hu *et al.*, Blood 101, 4853-4861 (2003) y la publicación de patente de EE. UU. n.º 2003/0124678; Shanafelt *et al.*, Nature Biotechnol 18, 1197-1202 (2000); Heaton *et al.*, Cancer Res 53, 2597-602 (1993) y la patente de EE. UU. n.º 5.229.109; la publicación de patente de EE. UU. n.º 2007/0036752; el documento WO 2008/0034473; el documento WO 2009/061853; o en el presente documento anteriormente y a continuación.

Como se usa en el presente documento, el término "monocatenaria" se refiere a una molécula que comprende monómeros de aminoácidos unidos linealmente por enlaces peptídicos. En un modo de realización, el resto efector es un resto efector monocatenario. Los ejemplos no limitantes de restos efectoros monocatenarios incluyen citocinas, factores de crecimiento, hormonas, enzimas, sustratos y cofactores. Cuando el resto efector es una citocina y la citocina de interés se encuentra normalmente como un multímero en la naturaleza, cada subunidad de la citocina multimérica se codifica secuencialmente por la cadena sencilla del resto efector. En consecuencia, los ejemplos no limitantes de restos efectoros monocatenarios útiles incluyen GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TGF- β , TNF- α y TNF- β .

Como se usa en el presente documento, el término "resto efector de control" se refiere a un resto efector no conjugado. Por ejemplo, cuando se compara un inmunoconjugado de IL-2 como se describe en el presente documento con un resto efector de control, el resto efector de control es IL-2 libre no conjugada. Asimismo, por ejemplo, cuando se compara un inmunoconjugado de IL-12 con un resto efector de control, el resto efector de control es IL-12 libre, no conjugada (por ejemplo, existente como una proteína heterodimérica en la que las subunidades p40 y p35 comparten solo enlace(s) disulfuro).

Como se usa en el presente documento, el término "receptor de resto efector" se refiere a una molécula de polipéptido que se puede unir específicamente a un resto efector. Por ejemplo, cuando IL-2 es el resto efector, el receptor del resto efector que se une a una molécula de IL-2 (por ejemplo, un inmunoconjugado que comprende IL-2) es el receptor de IL-2. De forma similar, por ejemplo, cuando IL-12 es el resto efector de un inmunoconjugado, el receptor del resto efector es el receptor de IL-12. Cuando un resto efector se une específicamente a más de un receptor, todos los receptores que se unen específicamente al resto efector son "receptores del resto efector" para ese resto efector.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, que incluyen pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada y comprendan una región Fc o una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente

documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de inmunoglobulina natural.

El término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que tiene la estructura de un anticuerpo natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase IgG son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que se unen con enlaces disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también llamados región constante de la cadena pesada. De forma similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio constante ligero (CL), también llamado región constante de la cadena ligera. La cadena pesada de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de cinco tipos, llamados α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), algunos de los cuales se pueden dividir además en subtipos, por ejemplo, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) y α_2 (IgA₂). La cadena ligera de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basados en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina consiste esencialmente en dos moléculas Fab y una región Fc, unidas por medio de la región bisagra de inmunoglobulina.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocaténario (por ejemplo, scFv), anticuerpos de dominio único y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plückthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítomos de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo pero sin limitarse a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

El término "dominio de unión a antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria a parte o la totalidad de un antígeno. Se puede proporcionar un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, por uno o más dominios variables de anticuerpo (también llamados regiones variables de anticuerpo). En particular, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo.

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

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles definidos estructuralmente ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden en general residuos aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), siendo las últimas las de variabilidad de secuencia más alta y/o estando implicadas en el reconocimiento antigénico. Con la excepción de la CDR1 en VH, las CDR comprenden en general los residuos aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las regiones hipervariables (HVR) también se denominan "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), y estos términos se usan en el presente documento de manera intercambiable en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región particular se ha descrito por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) y Chothia *et al.*, J Mol Biol 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen residuos aminoácidos superpuestos o subconjuntos de los mismos cuando se comparan entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo esté dentro del alcance del término como se define y se usa en el presente documento. Los residuos aminoácidos

apropiados que engloban las CDR, como se define por cada una de las referencias citadas anteriormente, se exponen a continuación en la tabla 1 a modo de comparación. Los números de residuos exactos que engloba una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de forma rutinaria los residuos que comprende una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

TABLA 1. Definiciones de CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
CDR1 V _H	31-35	26-32	26-35
CDR2 V _H	50-65	52-58	50-58
CDR3 V _H	95-102	95-102	95-102
CDR1 V _L	24-34	26-32	24-34
CDR2 V _L	50-56	50-52	50-56
CDR3 V _L	89-97	91-96	89-97

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

² "AbM" con una "b" minúscula, como se usa en la tabla 1, se refiere a las CDR como se define por el programa informático de modelado de anticuerpos "AbM" de Oxford Molecular.

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

Las secuencias polipeptídicas del listado de secuencias (es decir, SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, etc.) no están numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, está dentro de la habilidad del experto en la técnica convertir la numeración de las secuencias del listado de secuencias a la numeración de Kabat.

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

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

El término "región Fc" o "dominio Fc" se usa en el presente documento para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente por extenderse de Cys226, o de Pro230, al extremo carboxiterminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de residuos aminoácidos en la región Fc o región constante está de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Una "región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina" pretende incluir variantes alélicas naturales de la región Fc de una inmunoglobulina así como variantes que tienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones pero que no disminuyen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina para mediar funciones efectoras (tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Por ejemplo, se pueden eliminar uno o más aminoácidos del extremo N o del extremo C de la región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de la función biológica. Dichas variantes se pueden seleccionar de acuerdo con las reglas generales conocidas en la

técnica para que tenga un efecto mínimo sobre la actividad (véase, por ejemplo, Bowie *et al.*, Science 247, 1306-10 (1990)).

Una "modificación que promueve la heterodimerización" es una manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones postraduccionales de un polipéptido, por ejemplo, una cadena pesada de inmunoglobulina, que reduce o impide la asociación del polipéptido con un polipéptido idéntico para formar un homodímero. Una modificación que promueve la heterodimerización como se usa en el presente documento incluye en particular las modificaciones separadas hechas a cada uno de dos polipéptidos deseados para formar un dímero, en el que las modificaciones son complementarias entre sí para promover la asociación de los dos polipéptidos. Por ejemplo, una modificación que promueve la heterodimerización puede alterar la estructura o carga de uno o ambos de los polipéptidos deseados para formar un dímero para hacer su asociación estérica o electrostáticamente favorable, respectivamente. La heterodimerización se produce entre dos polipéptidos no idénticos, tales como dos cadenas pesadas de inmunoglobulina en las que los componentes de inmunoconjugados adicionales fusionados a cada una de las cadenas pesadas (por ejemplo, el resto efector) no son iguales. En los inmunoconjugados de la presente invención, la modificación que promueve la heterodimerización está en la(s) cadena(s) pesada(s), específicamente en la región Fc, de una molécula de inmunoglobulina. En algunos modos de realización, la modificación que promueve la heterodimerización comprende una mutación aminoacídica, específicamente una sustitución aminoacídica. En un modo de realización particular, la modificación que promueve la heterodimerización comprende una mutación aminoacídica separada, específicamente una sustitución aminoacídica, en cada una de las dos cadenas pesadas de inmunoglobulina.

El término "funciones efectoras" cuando se usa en referencia a los anticuerpos se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión a receptor de Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, captación de antígenos mediada por complejo inmunitario por células presentadoras de antígenos, regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

Como se usa en el presente documento, el término "células efectoras" se refiere a una población de linfocitos que muestran receptores de restos efectoras, por ejemplo, receptores de citocinas, y/o receptores de Fc en su superficie a través de los que se unen a un resto efector, por ejemplo, una citocina, y/o una región Fc de un anticuerpo y contribuyen a la destrucción de células diana, por ejemplo, células tumorales. Las células efectoras pueden, por ejemplo, mediar efectos citotóxicos o fagocíticos. Las células efectoras incluyen, pero no se limitan a, linfocitos T efectoras tales como linfocitos T citotóxicos CD8⁺, linfocitos T auxiliares CD4⁺, linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos NK, linfocitos citolíticos activados por linfocina (LAK) y macrófagos/monocitos. Dependiendo del patrón de expresión de su receptor puede haber subconjuntos diferentes de células efectoras, es decir (a) células que expresan receptores para un resto efector particular pero no receptores de Fc y se estimulan por los inmunoconjugados pero no por los anticuerpos de la invención (por ejemplo, linfocitos T, que expresan los receptores de IL-2); (b) células que expresan receptores de Fc pero no receptores para un resto efector particular y se estimulan por los anticuerpos pero no por los inmunoconjugados de la invención; y (c) células que expresan tanto receptores de Fc como receptores para un resto efector particular y se estimulan simultáneamente por los anticuerpos y los inmunoconjugados de la invención (por ejemplo, linfocitos NK, que expresan receptores de Fc γ III y receptores de IL-2).

Como se usa en el presente documento, se considera que los términos "genomanipulación, genomanipulado, genomanipula" incluyen cualquier manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones postraduccionales de un polipéptido natural o recombinante o fragmento del mismo. La genomanipulación incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glucosilación o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de estos enfoques. La "genomanipulación", en particular con el prefijo "gluco", así como el término "genomanipulación de la glucosilación" incluye la genomanipulación metabólica de la maquinaria de glucosilación de una célula, incluyendo las manipulaciones genéticas de las vías de síntesis de los oligosacáridos para lograr una alteración de la glucosilación de las glucoproteínas expresadas en las células. Además, la genomanipulación de la glucosilación incluye los efectos de las mutaciones y del medio celular sobre la glucosilación. En un modo de realización, la genomanipulación de la glucosilación es una alteración en la actividad de glucosiltransferasa. En un modo de realización particular, la genomanipulación da como resultado una actividad glucosaminiltransferasa y/o actividad fucosiltransferasa alteradas. La genomanipulación de la glucosilación se puede usar para obtener una "célula huésped que tenga una actividad GnTIII incrementada" (por ejemplo, una célula huésped que se ha manipulado para expresar niveles incrementados de uno o más polipéptidos que tienen actividad β -(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), una "célula huésped que tiene actividad ManII incrementada" (por ejemplo, una célula huésped que se ha manipulado para expresar niveles incrementados de uno o más polipéptidos que tienen actividad α -manosidasa II (ManII)) o una "célula huésped que tiene actividad α -(1,6)-fucosiltransferasa disminuida" (por ejemplo, una célula huésped que se ha manipulado para expresar niveles disminuidos de α -(1,6)-fucosiltransferasa).

El término "mutación aminoacídica", como se usa en el presente documento, pretende englobar sustituciones, deleciones, inserciones y modificaciones aminoacídicas. Se puede realizar cualquier combinación de sustitución,

deleción, inserción y modificación para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión reducida a un receptor de Fc. Las deleciones e inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen deleciones e inserciones de aminoácidos amino y/o carboxiterminales. Las mutaciones aminoacídicas particulares son sustituciones aminoacídicas. Con el propósito de alterar, por ejemplo, las características de unión de una región Fc, son en particular preferentes las sustituciones aminoacídicas no conservadoras, es decir, el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas diferentes. Las sustituciones aminoacídicas incluyen el reemplazo por aminoácidos no naturales o por derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina, 5-hidroxilisina). Se pueden generar mutaciones aminoacídicas usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis dirigida a sitio, PCR, síntesis génica y similares. Se contempla que también pueden ser útiles procedimientos de alteración del grupo de cadena lateral de un aminoácido por procedimientos distintos de genomanipulación, tales como modificación química. Se pueden usar diversas designaciones en el presente documento para indicar la misma mutación aminoacídica. Por ejemplo, una sustitución de prolina en la posición 329 de la región Fc por glicina se puede indicar como 329G, G329, G₃₂₉, P329G o Pro329Gly.

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

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

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

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pasos. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento. Una célula huésped es cualquier tipo de sistema celular que se puede usar para generar los anticuerpos e inmunoconjugados usados para la presente invención. En un modo de realización, la célula huésped se genomanipula para permitir la producción de un anticuerpo con oligosacáridos modificados. En determinados modos de realización, las células huésped se han manipulado para expresar niveles incrementados de uno o más polipéptidos que tienen actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII). En determinados modos de realización, las células huésped se han manipulado adicionalmente para expresar niveles incrementados de uno o más polipéptidos que tienen actividad α -manosidasa II (ManII). Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de

mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido que tiene actividad GnTIII" se refiere a polipéptidos que pueden catalizar la adición de un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en un enlace β -1,4 al manósido unido a β del núcleo de trimanosilo de oligosacáridos unidos a N. Esto incluye polipéptidos de fusión que presentan actividad enzimática similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de la β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como β -1,4-manosil-glucoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminiltransferasa (EC 2.1.4/144), de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), como se mide en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso de que exista dependencia de la dosis, no necesita ser idéntica a la de GnTIII, sino en su lugar, sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada en comparación con la GnTIII (es decir, el polipéptido candidato presentará mayor actividad o no más de aproximadamente 25 veces menos y, preferentemente, no más de unas diez veces menos actividad, y lo más preferentemente, no más de unas tres veces menos actividad en relación con la GnTIII). En determinados modos de realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización de Golgi de un polipéptido heterólogo residente en Golgi. En particular, el dominio de localización de Golgi es el dominio de localización de manosidasa II o GnTI, lo más en particular el dominio de localización de manosidasa II. De forma alternativa, el dominio de localización de Golgi se selecciona del grupo que consiste en: el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de GnTII y el dominio de localización de la α -1,6-fucosiltransferasa del núcleo. Los procedimientos para generar dichos polipéptidos de fusión y usarlos para producir anticuerpos con funciones efectoras incrementadas se divulgan en el documento WO 2004/065540, la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 60/495.142 y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0241817.

Como se usa en el presente documento, el término "dominio de localización de Golgi" se refiere a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido residente en Golgi que es responsable de anclar el polipéptido a una localización dentro del aparato de Golgi. En general, los dominios de localización comprenden "colas" aminoterminales de una enzima.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido que tiene actividad ManII" se refiere a polipéptidos que pueden catalizar la hidrólisis de los residuos terminales de α -D-manosa unidos a 1,3 y 1,6 en el producto intermedio ramificado de manosa GlcNAcMan₅GlcNAc₂ de oligosacáridos unidos a N. Esto incluye polipéptidos que presentan una actividad enzimática similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de la α -manosidasa II de Golgi, también conocida como oligosacárido de manosilo 1,3-1,6- α -manosidasa II (EC 3.1.2/114), de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB).

Un "receptor de Fc activador" es un receptor de Fc que, después del acoplamiento por una región Fc de un anticuerpo, provoca eventos de señalización que estimulan a la célula portadora del receptor para realizar funciones efectoras. Los receptores de Fc activadores incluyen Fc γ RIIIa (CD16a), Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32) y Fc α RI (CD89).

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

Por "anticuerpo que tiene citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada/reducida" se entiende un anticuerpo que tiene una ADCC incrementada/reducida determinada por cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica. Un ensayo de ADCC *in vitro* aceptado es como sigue:

1) el ensayo usa células diana que son conocidas por expresar el antígeno diana reconocido por la región de unión a antígeno del anticuerpo;

2) el ensayo usa leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) humanos, aislados de sangre de un donante sano elegido al azar, como células efectoras;

3) se lleva a cabo el ensayo de acuerdo con el siguiente protocolo:

i) se aíslan los PBMC usando procedimientos de centrifugación por densidad estándar y se suspenden a 5×10^6 células/ml en medio de cultivo celular RPMI;

ii) se cultivan las células diana por procedimientos de histocultivo estándar, se recogen de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad mayor de un 90 %, se lavan en medio de cultivo celular RPMI, se marcan con 100 microcurios de ^{51}Cr , se lavan dos veces con medio de cultivo celular y se resuspenden en medio de cultivo celular a una densidad de 10^5 células/ml;

iii) se transfieren 100 microlitros de la suspensión de células diana final anterior a cada pocillo de una placa de microvaloración de 96 pocillos;

iv) se diluye el anticuerpo en serie de 4000 ng/ml a 0,04 ng/ml en medio de cultivo celular y se añaden 50 microlitros de las soluciones de anticuerpo resultantes a las células diana en la placa de microvaloración de 96 pocillos, sometiendo a prueba por triplicado diversas concentraciones de anticuerpo que abarcan todo el intervalo de concentraciones anterior;

v) para los controles de liberación máxima (MR), 3 pocillos adicionales de la placa que contienen las células diana marcadas reciben 50 microlitros de una solución acuosa al 2 % (v/v) de un detergente no iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis), en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);

vi) para los controles de liberación espontánea (SR), 3 pocillos adicionales en la placa que contiene las células diana marcadas reciben 50 microlitros de medio de cultivo celular RPMI en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);

vii) a continuación, se centrifuga la placa de microvaloración de 96 pocillos a 50 x g durante 1 minuto y se incuba durante 1 hora a 4 °C;

viii) Se añaden 50 microlitros de la suspensión de PBMC (punto i anterior) a cada pocillo para proporcionar una proporción de células efectoras:diana de 25:1 y se disponen las placas en una estufa de incubación en una atmósfera con un CO_2 al 5 % a 37 °C durante 4 horas;

ix) se recoge el sobrenadante sin células de cada pocillo y se cuantifica la radioactividad liberada experimentalmente (ER) usando un contador gamma;

x) se calcula el porcentaje de lisis específica para cada concentración de anticuerpo de acuerdo con la fórmula $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$, donde ER es la radioactividad promedio cuantificada (véase el punto ix anterior) para esa concentración de anticuerpo, MR es la radioactividad promedio cuantificada (véase el punto ix anterior) para los controles de MR (véase el punto v anterior) y SR es la radioactividad promedio cuantificada (véase el punto ix anterior) para los controles de SR (véase el punto vi anterior);

4) "ADCC incrementada/reducida" se define como un incremento/reducción en el porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a prueba anterior, y/o bien como una reducción/incremento en la concentración de anticuerpo requerida para lograr la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a prueba anterior. El incremento/reducción de la ADCC es en relación con la ADCC, medida con el ensayo anterior, mediada por el mismo anticuerpo, producida por el mismo tipo de células huésped, usando los mismos procedimientos estándar de producción, purificación, formulación y almacenamiento, que se conocen por los expertos en la técnica, pero que no se ha genomaniplado.

Como se usa en el presente documento, "combinación" (y las variaciones gramaticales de la misma tales como "combinar" o "que combina") engloba las combinaciones de un inmunoconjugado y un anticuerpo de acuerdo con la invención en las que el inmunoconjugado y el anticuerpo están en el mismo recipiente o en diferentes recipientes, en la misma formulación o en diferentes formulaciones farmacéuticas, se administran conjuntamente o por separado, se administran simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, y se administran por la misma vía o por diferentes vías, siempre que el inmunoconjugado y el anticuerpo puedan ejercer simultáneamente sus efectos biológicos en el organismo, es decir estimular simultáneamente las células efectoras. Por ejemplo, "combinar" un inmunoconjugado y un anticuerpo de acuerdo con la invención puede significar administrar en primer lugar el inmunoconjugado en una formulación farmacéutica particular, seguido de la administración del anticuerpo en otra formulación farmacéutica, o viceversa.

Una "cantidad eficaz" de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para dar como resultado un cambio

fisiológico en la célula o tejido al que se administra.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye, retrasa, minimiza o previene efectos adversos de una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de varios ingredientes activos puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno de los ingredientes activos. De forma alternativa, para reducir los efectos secundarios provocados por el tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de varios ingredientes activos puede ser cantidades de los ingredientes activos individuales que son eficaces para producir un efecto aditivo, o superaditivo o sinérgico, y que en combinación son terapéuticamente eficaces, pero que pueden ser cantidades subterapéuticas de uno o varios de los ingredientes activos si se usaran solos.

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

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

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

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

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

Inmunoconjugados

Los inmunoconjugados útiles en la presente invención son moléculas polipeptídicas que comprenden un resto efector y un anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida, en comparación con un anticuerpo correspondiente no genomanipulado.

Los inmunoconjugados se pueden preparar conjugando químicamente el resto efector con el anticuerpo, o expresando el resto efector y el anticuerpo como una proteína de fusión (véase, por ejemplo, Nakamura y Kubo, Cancer 80, 2650-2655 (1997); y Becker *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 93, 7826-7831 (1996)). Para su uso en la presente invención, en general, son preferentes los inmunoconjugados expresados como proteínas de fusión. En consecuencia, en determinados modos de realización, el resto efector comparte un enlace peptídico amino o carboxiterminal con el anticuerpo (es decir, el inmunoconjugado es una proteína de fusión). En dichos inmunoconjugados, un resto efector se puede fusionar, por ejemplo, a una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina. En particular son útiles en la presente invención los inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo de clase IgG de longitud completa, en particular un anticuerpo de subclase IgG₁ de longitud completa.

En un modo de realización, el resto efector es un resto efector monocatenario. En un modo de realización, el resto efector es una citocina. Los anticuerpos y restos efectores del inmunoconjugado incluyen los que se describen en detalle en el presente documento anteriormente y a continuación. El anticuerpo del inmunoconjugado se puede dirigir contra una variedad de moléculas diana (por ejemplo, un determinante antigénico en una molécula de proteína expresada en una célula tumoral o estroma tumoral). Los ejemplos no limitantes de anticuerpos se describen en el presente documento. Los inmunoconjugados en particular útiles como se describe en el presente documento presentan típicamente una o más de las siguientes propiedades: alta especificidad de acción, toxicidad reducida, buena capacidad de producción y/o estabilidad mejorada, en particular en comparación con inmunoconjugados de diferentes configuraciones dirigidos a los mismos determinantes antigénicos y que portan los mismos restos efectores. Los inmunoconjugados particulares para su uso en la presente invención se describen adicionalmente en

la publicación de PCT número WO 2012/146628.

Formatos de inmunoconjugados

Los inmunoconjugados descritos en la publicación de PCT número WO 2012/146628 comprenden no más de un resto efector. En consecuencia, en un modo de realización particular, el inmunoconjugado para su uso en la presente invención comprende no más de un resto efector. En un modo de realización particular, el resto efector es un resto efector monocatenario. El anticuerpo comprendido en los inmunoconjugados de acuerdo con la invención es en particular un anticuerpo de clase IgG de longitud completa, más en particular un anticuerpo de subclase IgG₁ de longitud completa. En un modo de realización, el anticuerpo es humano. En otros modos de realización, el anticuerpo es humanizado o quimérico. En un modo de realización, el anticuerpo comprende una región Fc humana, más en particular una región Fc de IgG humana, lo más en particular una región Fc de IgG₁ humana. Los anticuerpos útiles en la invención pueden comprender una región constante de la cadena pesada gamma 1 de Ig humana, como se expone en SEQ ID NO: 124 (es decir, los anticuerpos son de la subclase IgG₁ humana).

En un modo de realización, el resto efector comparte un enlace peptídico amino o carboxiterminal con el anticuerpo. En un modo de realización, el inmunoconjugado consiste esencialmente en un resto efector y un anticuerpo, en particular un anticuerpo de clase IgG, más en particular un anticuerpo de subclase IgG₁, unido por uno o más conectores peptídicos. En un modo de realización específico, el resto efector se fusiona en su aminoácido aminoterminal con el aminoácido carboxiterminal de una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina, opcionalmente a través de un conector peptídico.

En determinados modos de realización, en particular cuando el inmunoconjugado comprende solo un único resto efector, el anticuerpo comprende en la región Fc una modificación que promueve la heterodimerización de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina no idénticas. El sitio de la interacción proteína-proteína más extensa entre las dos cadenas polipeptídicas de una región Fc de IgG humana está en el dominio CH3 de la región Fc. Por tanto, en un modo de realización, dicha modificación está en el dominio CH3 de la región Fc. En un modo de realización específico, dicha modificación es una modificación de botón en ojal, que comprende una modificación de botón en una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina y una modificación de ojal en la otra de las cadenas pesadas de inmunoglobulina. La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway *et al.*, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfase de un primer polipéptido y una correspondiente cavidad ("ojal") en la interfase de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se puede situar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano).

Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). La protuberancia y la cavidad se pueden realizar alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, por mutagénesis específica de sitio o por síntesis peptídica. En un modo de realización específico, una modificación de botón comprende la sustitución aminoacídica T366W en una de las dos cadenas pesadas de inmunoglobulina, y la modificación de ojal comprende las sustituciones aminoacídicas T366S, L368A e Y407V en la otra de las dos cadenas pesadas de inmunoglobulina (numeración de Kabat). En otro modo de realización específico, la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la modificación de botón comprende adicionalmente la sustitución aminoacídica S354C, y la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la modificación de ojal comprende adicionalmente la sustitución aminoacídica Y349C. La introducción de estos dos residuos de cisteína da como resultado la formación de un puente de disulfuro entre las dos cadenas pesadas, estabilizando adicionalmente el dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

En un modo de realización particular, el resto efector se une al aminoácido carboxiterminal de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la modificación de botón.

En un modo de realización alternativo, una modificación que promueve la heterodimerización de dos cadenas polipeptídicas no idénticas comprende una modificación que media los efectos de conducción electrostática, por ejemplo, como se describe en la publicación de PCT WO 2009/089004. En general, este procedimiento implica el reemplazo de uno o más residuos aminoacídicos en la interfaz de las dos cadenas polipeptídicas por residuos aminoacídicos cargados de modo que la formación de homodímeros se vuelve electrostáticamente desfavorable pero la heterodimerización se vuelve electrostáticamente favorable.

Una región Fc confiere al inmunoconjugado propiedades farmacocinéticas favorables, que incluyen una semivida en suero prolongada que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y a una proporción de distribución tejido-sangre favorable. Al mismo tiempo, sin embargo, puede dar lugar a dirigir de forma indeseable el inmunoconjugado a células que expresan receptores de Fc en lugar de a las células que portan antígenos preferentes. Además, la coactivación de las vías de señalización del receptor de Fc puede dar lugar a la liberación de citocinas que, en combinación con el resto efector y la larga semivida del inmunoconjugado, da como resultado

una activación excesiva de los receptores de citocinas y efectos secundarios graves tras la administración sistémica. De acuerdo con esto, se ha descrito que los inmunoconjugados de IgG-IL-2 convencionales se asocian con reacciones a la infusión (véase, por ejemplo, King *et al.*, J Clin Oncol 22, 4463-4473 (2004)).

- 5 En consecuencia, el anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado se genomanipula para que tenga una función efectora reducida, en comparación con un anticuerpo correspondiente no genomanipulado. En modos de realización particulares, la función efectora reducida es la unión reducida a un receptor de Fc activador. En un modo de realización de este tipo, el anticuerpo comprende en su región Fc una o más mutaciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión del inmunoconjugado a un receptor de Fc activador. Típicamente, la misma o más mutaciones aminoacídicas están presentes en cada una de las dos cadenas pesadas de inmunoglobulina. En un modo de realización, dicha mutación aminoacídica reduce la afinidad de unión del inmunoconjugado al receptor de Fc activador en al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces. En modos de realización donde hay más de una mutación aminoacídica que reduce la afinidad de unión del inmunoconjugado al receptor de Fc activador, la combinación de estas mutaciones aminoacídicas puede reducir la afinidad de unión del inmunoconjugado al receptor de Fc activador en al menos 10 veces, al menos 20 veces o incluso al menos 50 veces. En un modo de realización, el inmunoconjugado que comprende un anticuerpo genomanipulado presenta menos de un 20 %, en particular menos de un 10 %, más en particular menos de un 5 % de la afinidad de unión a un receptor de Fc activador en comparación con un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo no genomanipulado. En un modo de realización específico, el receptor de Fc activador es un receptor de Fc γ , más específicamente Fc γ RIIIa, Fc γ RI o Fc γ RIIa. Preferentemente, se reduce la unión a cada uno de estos receptores. En algunos modos de realización también se reduce la afinidad de unión por un componente del complemento, específicamente la afinidad de unión por C1q. En un modo de realización, no se reduce la afinidad de unión por el receptor de Fc neonatal (FcRn). Se logra una unión sustancialmente similar a FcRn, es decir, la conservación de la afinidad de unión del anticuerpo a dicho receptor, cuando el anticuerpo (o el inmunoconjugado que comprende dicho anticuerpo) presenta más de aproximadamente un 70 % de la afinidad de unión de una forma no genomanipulada del anticuerpo (o el inmunoconjugado que comprende dicha forma no genomanipulada del anticuerpo) a FcRn. Los anticuerpos, o inmunoconjugados que comprenden dichos anticuerpos, pueden presentar más de aproximadamente un 80 % e incluso más de aproximadamente un 90 % de dicha afinidad. En un modo de realización, la mutación aminoacídica es una sustitución aminoacídica. En un modo de realización, el anticuerpo, en particular un anticuerpo de subclase IgG₁ humana, comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329 de la cadena pesada de inmunoglobulina (numeración de Kabat). En un modo de realización más específico, la sustitución aminoacídica es P329A o P329G, en particular, P329G. En un modo de realización, el anticuerpo comprende otra sustitución aminoacídica en una posición seleccionada de S228, E233, L234, L235, N297 y P331 de la cadena pesada de inmunoglobulina. En un modo de realización más específico, la otra sustitución aminoacídica es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En un modo de realización particular, el anticuerpo comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones P329, L234 y L235 de la cadena pesada de inmunoglobulina (numeración de Kabat). En un modo de realización más particular, el anticuerpo comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (LALA P329G) en la cadena pesada de inmunoglobulina. Esta combinación de sustituciones aminoacídicas casi suprime, en particular, de forma eficaz la unión del receptor de Fc γ de una molécula de IgG humana y, por consiguiente, reduce la función efectora incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), como se describe en la publicación de PCT n.º WO 2012/130831. El documento WO 2012/130831 también describe procedimientos de preparación de dichos anticuerpos mutantes y procedimientos para determinar sus propiedades tales como la unión al receptor de Fc o funciones efectoras.
- 45 Los anticuerpos mutantes se pueden preparar por delección, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis específica de sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios nucleotídicos correctos se pueden verificar, por ejemplo, por secuenciación.
- 50 La unión a receptores de Fc se puede determinar fácilmente, por ejemplo, por ELISA, o por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores de Fc tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. Un ensayo de unión de este tipo adecuado se describe en el presente documento. De forma alternativa, la afinidad de unión de los anticuerpos o los inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo para los receptores de Fc se puede evaluar usando líneas celulares conocidas por expresar receptores de Fc particulares, tales como linfocitos NK que expresan el receptor de Fc γ RIIIa.
- 55

En algunos modos de realización, el anticuerpo del inmunoconjugado se genomanipula para que tenga una función efectora reducida, en particular una ADCC reducida, en comparación con un anticuerpo no genomanipulado.

- 60 La función efectora de un anticuerpo, o un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo, se puede medir por procedimientos conocidos en la técnica. Un ensayo adecuado para medir la ADCC se describe en el presente documento. Otros ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362; Hellstrom *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patente de EE. UU. n.º 5.821.337; Bruggemann *et al.*, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no
- 65

radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

En algunos modos de realización se altera la unión del anticuerpo a un componente del complemento, específicamente a C1q. En consecuencia, en algunos modos de realización en los que el anticuerpo se genomanipula para que tenga una función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye CDC reducida. Se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si el inmunoconjugado se puede unir a C1q y, por consiguiente, tiene actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg *et al.*, Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

En algunos modos de realización, el inmunoconjugado comprende uno o más sitios de escisión proteolítica localizados entre el resto efector y el anticuerpo. Los componentes del inmunoconjugado se pueden unir directamente o a través de diversos conectores, en particular conectores peptídicos que comprenden uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente de 2-20 aminoácidos, que se describen en el presente documento o se conocen en la técnica. Los conectores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos (G4S)_n, (SG4)_n o G4(SG4)_n, en los que n es, en general, un número entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4.

Anticuerpos de inmunoconjugados

El anticuerpo del inmunoconjugado de la invención es, en general, una molécula de inmunoglobulina que se une a un determinante antigénico específico y puede dirigir la entidad a la que está unido (por ejemplo, un resto efector) a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que porta el determinante antigénico. El inmunoconjugado se puede unir a determinantes antigénicos encontrados, por ejemplo, en las superficies de células tumorales, en las superficies de células infectadas por virus, en las superficies de otras células enfermas, libres en el suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (MEC). Los ejemplos no limitantes de antígenos tumorales incluyen MAGE, MART-1/melan A, gp100, dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosinadesaminasa (ADA_{bp}), ciclofilina b, antígeno colorrectal asociado (CRC)-C017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos inmunogénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno prostático específico (PSA) y sus epítomos inmunogénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, antígeno prostático específico de membrana (PSMA), receptor de linfocitos T/cadena zeta-CD3, familia MAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α-fetoproteína, E-cadherina, α-catenina, β-catenina y γ-catenina, p120ctn, gp100 Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de poliposis adenomatosa coli (APC), fodrina, conexina 37, idiотipo de Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos víricos tales como proteínas del papilomavirus humano, familia Smad de antígenos tumorales, Imp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, glucógeno fosforilasa cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2. Los ejemplos no limitantes de antígenos víricos incluyen hemaglutinina del virus de la gripe, PLM-1 del virus de Epstein-Barr, glucoproteína E2 del virus de la hepatitis C, gp160 del VIH y gp120 del VIH. Los ejemplos no limitantes de antígenos de la MEC incluyen sindecano, heparanasa, integrinas, osteopontina, enlace, cadherinas, laminina, EGF de tipo laminina, lectina, fibronectina, Notch, tenascina y matrixina. Los inmunoconjugados de la invención se pueden unir a los siguientes ejemplos específicos no limitantes de antígenos de superficie celular: FAP, Her2, EGFR, IGF-1R, CD2 (antígeno de superficie de linfocitos T), CD3 (heteromultímero asociado al TCR), CD22 (receptor de linfocitos B), CD23 (receptor de IgE de baja afinidad), CD25 (cadena α del receptor de IL-2), CD30 (receptor de citocina), CD33 (antígeno de superficie celular mieloide), CD40 (receptor del factor de necrosis tumoral), IL-6R (receptor de IL6), CD20, MCSP, c-Met, proteína 1 que contiene el dominio CUB (CDCP1) y PDGFβR (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas β).

En determinados modos de realización, el anticuerpo se dirige a un antígeno presentado en una célula tumoral o en un entorno de células tumorales. En un modo de realización específico, el anticuerpo se dirige a un antígeno seleccionado del grupo de proteína de activación de fibroblastos (FAP), el dominio A1 de tenascina C (TNC A1), el dominio A2 de tenascina C (TNC A2), el dominio adicional B de fibronectina (EDB), antígeno carcinoembrionario (CEA) y proteoglicano de sulfato de condroitina asociado al melanoma (MCSP).

El anticuerpo puede ser cualquier tipo de anticuerpo o fragmento del mismo que conserva la unión específica a un determinante antigénico y comprende una región Fc. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. Los anticuerpos preferentes en particular son inmunoglobulinas de la clase IgG, específicamente

de la subclase IgG₁.

En un modo de realización, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo que es específico para el dominio A1 y/o A4 de tenascina (TNC-A1 o TNC-A4 o TNC-A1/A4). En un modo de realización específica, el anticuerpo del
5 inmunoconjugado comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 8 o bien a SEQ ID NO: 9, o a variantes de la misma que conservan la funcionalidad. En otro modo de realización específico, el anticuerpo del inmunoconjugado comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al
10 menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 6 o bien a SEQ ID NO: 7, o a variantes de la misma que conservan la funcionalidad. En un modo de realización más específico, el anticuerpo del inmunoconjugado comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID
15 NO: 8 o bien a SEQ ID NO: 9 o a variantes de la misma que conservan la funcionalidad, y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 6 o bien a SEQ ID NO: 7 o a variantes de la misma que conservan la funcionalidad.

En un modo de realización, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo que es específico para el dominio A2 de tenascina (TNC-A2). En un modo de realización específico, el anticuerpo del inmunoconjugado comprende una
20 secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 85, o a variantes de la misma que conservan la funcionalidad. En otro modo de realización específico, el anticuerpo del inmunoconjugado comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al
25 menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 84, o a variantes de la misma que conservan la funcionalidad. En un modo de realización más específico, el anticuerpo del inmunoconjugado comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID
30 NO: 5, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 85, o a variantes de la misma que conservan la funcionalidad, y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 70, SEQ ID
35 NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 84, o a variantes de la misma que conservan la funcionalidad.

En un modo de realización, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo que es específico para la proteína activada por fibroblastos (FAP). En un modo de realización específico, el anticuerpo del inmunoconjugado
40 comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 69, o a variantes de la misma que conservan la funcionalidad. En otro modo de
45 realización específico, el anticuerpo del inmunoconjugado comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 68, o variantes de
50 las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización más específico, el anticuerpo del inmunoconjugado comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID
55 NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 69, o a variantes de la misma que conservan la funcionalidad, y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID
60 NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID
65 NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID

inmunoconjugado comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 114, o a una variante de la misma que conserva la funcionalidad, y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 115, o a una variante de la misma que conserva la funcionalidad. En otro modo de realización específico, el inmunoconjugado de la presente invención comprende una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 136 o a variantes de la misma que conservan la funcionalidad, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 137 o a variantes de la misma que conservan la funcionalidad, y una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 138 o a variantes de la misma que conservan la funcionalidad.

Los inmunoconjugados de acuerdo con la invención incluyen los que comprenden secuencias que son al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 3-87, 108-132 y 136-138, incluyendo los fragmentos funcionales o variantes de las mismas. Los inmunoconjugados de acuerdo con la invención también engloban anticuerpos que comprenden secuencias de SEQ ID NO: 3-127 con sustituciones aminoácidas conservadoras. Se entiende que en las secuencias de SEQ ID NO: 126, 128, 131, 134 y 137, se puede reemplazar la secuencia de la secuencia de la IL-2 mutante descrita en el presente documento (véase SEQ ID NO: 2) por la secuencia de IL-2 humana (véase SEQ ID NO: 1).

Restos efectores de los inmunoconjugados

Los restos efectores para su uso en la invención son, en general, polipéptidos que influyen en la actividad celular, por ejemplo, a través de vías de transducción de señales. En consecuencia, el resto efector del inmunoconjugado útil en la invención se puede asociar con la señalización mediada por receptor que transmite una señal desde el exterior de la membrana celular para modular una respuesta dentro de la célula. Por ejemplo, un resto efector del inmunoconjugado puede ser una citocina. En un modo de realización particular, el resto efector es un resto efector monocatenario como se define en el presente documento. En un modo de realización, el resto efector, típicamente un resto efector monocatenario, del inmunoconjugado de acuerdo con la invención es una citocina seleccionada del grupo que consiste en: IL-2, GM-CSF, IFN- α e IL-12. En un modo de realización, el resto efector es IL-2. En otro modo de realización, el resto efector monocatenario del inmunoconjugado es una citocina seleccionada del grupo que consiste en: IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β y TGF- β .

En un modo de realización, el resto efector, en particular un resto efector monocatenario, del inmunoconjugado es IL-2. En un modo de realización específico, el resto efector IL-2 puede provocar una o más de las respuestas celulares seleccionadas del grupo que consiste en: proliferación en un linfocito T activado, diferenciación en un linfocito T activado, actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL), proliferación en un linfocito B activado, diferenciación en un linfocito B activado, proliferación en un linfocito citolítico natural (NK), diferenciación en un linfocito NK, secreción de citocinas por un linfocito T activado o un linfocito NK, y citotoxicidad antitumoral de linfocitos NK activados por linfocinas (LAK). En determinados modos de realización, el resto efector IL-2 es un resto efector IL-2 mutante que comprende al menos una mutación aminoácida que reduce o suprime la afinidad del resto efector IL-2 mutante por la subunidad α del receptor de IL-2 (también conocido como CD25) pero conserva la afinidad del resto efector IL-2 mutante por el receptor de IL-2 de afinidad intermedia (que consiste en las subunidades β y γ del receptor de IL-2), en comparación con el resto efector IL-2 no mutado. En un modo de realización, las mutaciones aminoácidas son sustituciones aminoácidas. En un modo de realización específico, el resto efector IL-2 mutante comprende una, dos o tres sustituciones aminoácidas en una, dos o tres posiciones seleccionadas de las posiciones correspondientes al residuo 42, 45 y 72 de IL-2 humana (SEQ ID NO: 1). En un modo de realización más específico, el resto efector IL-2 mutante comprende tres sustituciones aminoácidas en las posiciones correspondientes al residuo 42, 45 y 72 de IL-2 humana. En un modo de realización incluso más específico, el resto efector IL-2 mutante es IL-2 humana que comprende las sustituciones aminoácidas F42A, Y45A y L72G. En un modo de realización, el resto efector IL-2 mutante comprende adicionalmente una mutación aminoácida en una posición correspondiente a la posición 3 de IL-2 humana, que elimina el sitio de O-glucosilación de IL-2. En particular, dicha mutación aminoácida adicional es una sustitución aminoácida que reemplaza un residuo de treonina por un residuo de alanina. La secuencia de una IL-2 mutante cuádruple (QM) que comprende las sustituciones aminoácidas T3A, F42A, Y45A y L72G se muestra en SEQ ID NO: 2. Las moléculas de IL-2 mutantes adecuadas se describen en más detalle en la publicación de PCT número WO 2012/107417.

Las moléculas de IL-2 mutantes útiles como restos efectores en los inmunoconjugados se pueden preparar por delección, sustitución, inserción o modificación usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis específica de sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios nucleotídicos correctos se pueden verificar, por ejemplo, por secuenciación. A este respecto, se ha descrito la secuencia de nucleótidos de IL-2 natural por Taniguchi *et al.* (Nature 302, 305-10 (1983)) y el ácido nucleico que codifica IL-2 humana está disponible en depósitos públicos tales como American Type Culture Collection (Rockville MD). Una secuencia ejemplar de IL-2 humana se muestra en SEQ

ID NO: 1. La sustitución o inserción puede implicar residuos aminoácidos naturales así como no naturales. La modificación de aminoácidos incluye procedimientos bien conocidos de modificación química tales como la adición o eliminación de sitios de glucosilación o uniones de glúcidos, y similares.

- 5 En un modo de realización, el resto efector, en particular un resto efector monocatenario, del inmunoconjugado es GM-CSF. En un modo de realización específico, el resto efector GM-CSF puede provocar la proliferación y/o diferenciación en un granulocito, un monocito o una célula dendrítica. En un modo de realización, el resto efector, en particular un resto efector monocatenario, del inmunoconjugado es IFN- α . En un modo de realización específico, el resto efector IFN- α puede provocar una o más de las respuestas celulares seleccionadas del grupo que consiste en:
- 10 inhibir la replicación vírica en una célula infectada por virus y regular por incremento la expresión del complejo principal de histocompatibilidad I (MHC I). En otro modo de realización específico, el resto efector IFN- α puede inhibir la proliferación en una célula tumoral. En un modo de realización, el resto efector, en particular un resto efector monocatenario, del inmunoconjugado es IL-12. En un modo de realización específico, el resto efector IL-12 puede provocar una o más de las respuestas celulares seleccionadas del grupo que consiste en: proliferación en un
- 15 linfocito NK, diferenciación en un linfocito T NK, proliferación en un linfocito T y diferenciación en un linfocito T. En un modo de realización, el resto efector, en particular un resto efector monocatenario, del inmunoconjugado es IL-8. En un modo de realización específico, el resto efector IL-8 puede provocar quimiotaxia en neutrófilos. En un modo de realización, el resto efector, en particular un resto efector monocatenario, del inmunoconjugado, es MIP-1 α . En un modo de realización específico, el resto efector PIM-1 α puede provocar quimiotaxia en monocitos y linfocitos T. En un modo de realización, el resto efector, en particular un resto efector monocatenario, del inmunoconjugado es PIM-1 β . En un modo de realización específico, el resto efector PIM-1 β puede provocar quimiotaxia en monocitos y linfocitos T. En un modo de realización, el resto efector, en particular un resto efector monocatenario, del inmunoconjugado es TGF- β . En un modo de realización específico, el resto efector TGF- β puede provocar una o más de las respuestas celulares seleccionadas del grupo que consiste en: quimiotaxia en monocitos, quimiotaxia en
- 20 macrófagos, regulación por incremento de la expresión de IL-1 en macrófagos activados y regulación por incremento de la expresión de IgA en linfocitos B activados.

Anticuerpos para su combinación con los inmunoconjugados

- 30 De acuerdo con la invención, los anticuerpos para su combinación con los inmunoconjugados se genomanipulan para que tengan una función efectora incrementada. Los anticuerpos útiles en la presente invención para su combinación con los inmunoconjugados incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen a un determinante antigénico específico, por ejemplo un antígeno de células tumorales específico, y comprenden una región Fc. En determinados modos de realización, el anticuerpo se dirige a un antígeno presentado en una célula
- 35 tumoral. Los antígenos diana particulares de los anticuerpos útiles en la presente invención incluyen los antígenos expresados en la superficie de células tumorales, que incluyen, pero no se limitan a, receptores de superficie celular tales como receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptores del factor de crecimiento insulínico (IGFR) y receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), antígeno carcinoembrionario (CEA), dipeptidilpeptidasa IV (CD26, DPPIV), FAP, HER2/neu, HER-3, E-cadherina, CD20, proteoglicano de sulfato de condroitina asociado al melanoma (MCSP), c-Met, proteína
- 40 1 que contiene el dominio CUB (CDCP1) y antígeno del carcinoma de células escamosas (SCCA).

- En un modo de realización específico, el anticuerpo se dirige a un antígeno seleccionado del grupo de CD20, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), HER2, HER3, receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R), antígeno carcinoembrionario (CEA), c-Met, proteína 1 que contiene el dominio CUB (CDCP1) y proteoglicano de sulfato de condroitina asociado al melanoma (MCSP). En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico dirigido a dos o más antígenos seleccionados del grupo de CD20, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), HER2, HER3, receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R), antígeno carcinoembrionario (CEA), c-Met, proteína 1 que contiene el dominio CUB (CDCP1) y proteoglicano de sulfato de condroitina asociado al melanoma (MCSP).
- 50

- Los anticuerpos anti-CD20 específicos útiles en la presente invención son anticuerpos anti-CD20 de tipo II de clase IgG humanizados, que tienen la especificidad de unión del anticuerpo B-Ly1 murino (Poppema y Visser, Biotest Bulletin 3, 131-139 (1987)). En particular, es útil un anticuerpo anti-CD20 de tipo II de clase IgG humanizado, que comprende
- 55

- a) en el dominio variable de la cadena pesada una CDR1 de SEQ ID NO: 88, una CDR2 de SEQ ID NO: 89 y una CDR3 de SEQ ID NO: 90, y
- 60 b) en el dominio variable de la cadena ligera una CDR1 de SEQ ID NO: 91, una CDR2 de SEQ ID NO: 92 y una CDR3 de SEQ ID NO: 93.

- En particular, las regiones estructurales (FR) de la región variable de la cadena pesada FR1, FR2 y FR3 de dicho anticuerpo son secuencias de FR humanas codificadas por la secuencia de la línea germinal humana VH1_10, la región variable de la cadena pesada FR4 de dicho anticuerpo es una secuencia de FR humana codificada por la secuencia de la línea germinal humana JH4, las FR de la región variable de la cadena ligera FR1, FR2 y FR3 de
- 65

dicho anticuerpo son secuencias de FR humanas codificadas por la secuencia de la línea germinal humana VK₂_40, y la región variable de la cadena ligera FR4 de dicho anticuerpo es una secuencia FR humana codificada por la secuencia de la línea germinal humana JK4.

- 5 Un anticuerpo anti-CD20 más particular que es útil en la presente invención comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 94 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 95.

Dichos anticuerpos anti-CD20 se describen en el documento WO 2005/044859.

- 10 Los anticuerpos anti-EGFR específicos útiles en la presente invención son anticuerpos de clase IgG humanizados, que tienen la especificidad de unión del anticuerpo ICR62 de rata (Modjtahedi *et al.*, Br J Cancer 67, 247-253 (1993)). En particular, es útil un anticuerpo anti-EGFR de clase IgG humanizado, que comprende

- 15 a) en el dominio variable de la cadena pesada una CDR1 de SEQ ID NO: 96, una CDR2 de SEQ ID NO: 97 y una CDR3 de SEQ ID NO: 98, y

b) en el dominio variable de la cadena ligera una CDR1 de SEQ ID NO: 99, una CDR2 de SEQ ID NO: 100 y una CDR3 de SEQ ID NO: 101.

- 20 Un anticuerpo anti-EGFR más particular que es útil en la invención comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 102 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 103.

Dichos anticuerpos anti-EGFR se describen en los documentos WO 2006/082515 y WO 2008/017963.

- 25 Otros anticuerpos anti-EGFR de clase IgG humanizados adecuados útiles para la invención incluyen cetuximab/IMC-C225 (Erbix[®], descrito en Goldstein *et al.*, Clin Cancer Res 1, 1311-1318 (1995)), panitumumab/ABX-EGF (Vectibix[®], descrito en Yang *et al.*, Cancer Res 59, 1236-1243 (1999), Yang *et al.*, Critical Reviews in Oncology/Hematology 38, 17-23 (2001)), nimotuzumab/h-R3 (TheraCim[®], descrito en Mateo *et al.*, Immunotechnology 3, 71-81 (1997); Crombet-Ramos *et al.*, Int J Cancer 101, 567-575 (2002), Boland & Bebb, Expert Opin Biol Ther 9, 1199-1206 (2009)), matuzumab/EMD 72000 (descrito en Bier *et al.*, Cancer Immunol Immunother 46, 167-173 (1998), Kim, Curr Opin Mol Ther 6, 96-103 (2004)), y zalutumumab/2F8 (descrito en Bleeker *et al.*, J Immunol 173, 4699-4707 (2004), Lammerts van Bueren, PNAS 105, 6109-6114 (2008)).

- 35 Los anticuerpos anti-IGF-1R específicos útiles en la presente invención se describen en los documentos WO 2005/005635 y WO 2008/077546, e inhiben la unión del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) y el factor de crecimiento insulínico 2 (IGF-2) al receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R).

- 40 Los anticuerpos anti-IGF-1R útiles para la invención son preferentemente anticuerpos monoclonales y, además, anticuerpos quiméricos (dominio constante humano), anticuerpos humanizados y, de manera especial, preferentemente anticuerpos completamente humanos. Los anticuerpos anti-IGF-1R particulares útiles para la invención se unen a IGF-1R humano en competencia con el anticuerpo 18, es decir, se unen al mismo epítipo de IGF-1R que el anticuerpo 18, que se describe en el documento WO 2005/005635. Los anticuerpos anti-IGF-1R particulares se caracterizan además por una afinidad hacia IGF-1R de 10^{-8} M (K_D) o menos, en particular de aproximadamente 10^{-9} a 10^{-13} M, y preferentemente no muestran inhibición detectable dependiente de la concentración de la insulina que se une al receptor de insulina.

- 45 Los anticuerpos anti-IGF-1R particulares útiles para la invención comprenden regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que tienen las siguientes secuencias:

- 50 a) una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDR CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 104 o 106;

b) una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDR CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 105 o 107.

- 55 En particular, los anticuerpos anti-IGF-1R útiles para la invención comprenden una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de SEQ ID NO: 104 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo de SEQ ID NO: 105, o una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de SEQ ID NO: 106 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo de SEQ ID NO: 107.

- 60 Los anticuerpos anti-IGF-1R particulares útiles para la invención se pueden obtener a partir de las líneas celulares de hibridoma <IGF-1R> HUMAB-Clone 18 e <IGF-1R> HUMAB-Clone 22, que están depositadas en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania, con los números de depósito DSM ACC 2587 y DSM ACC 2594, respectivamente.

- 65 Otros anticuerpos anti-IGF-1R adecuados útiles para la invención son, por ejemplo el mAb IgG₁ completamente humano cixutumumab/IMC-A12 (descrito en Burtrum *et al.*, Cancer Res 63, 8912-21 (2003);. Rowinsky *et al.*, Clin.

Cancer Res 13, 5549s-5555s (2007), el mAb IgG1 completamente humano AMG-479 (descrito en Beltran *et al.*, Mol Cancer Ther 8, 1095-1105 (2009); Tolcher *et al.*, J Clin Oncol 27, 5800-7 (2009)), el mAb IgG1 humanizado MK-0646/h7C10 (descrito en Goetsch *et al.*, Int J Cancer 113, 316-28 (2005); Broussas *et al.*, Int J Cancer 124, 2281-93 (2009); Hidalgo *et al.*, J Clin Oncol 26, resumen 3520 (2008); Atzori *et al.*, J Clin Oncol 26, resumen 3519 (2008)), el mAb IgG1 humanizado AVE1642 (descrito en Descamps *et al.*, Br J Cancer 100, 366-9 (2009); Tolcher *et al.*, J Clin Oncol 26, resumen 3582 (2008); Moreau *et al.*, Blood 110, resumen 1166 (2007); Maloney *et al.*, Cancer Res 63, 5073-83 (2003)), el mAb IgG2 completamente humano figitumumab/CP-751.871 (Cohen *et al.*, Clin Cancer Res 11, 2063-73 (2005); Haluska *et al.*, Clin Cancer Res 13, 5834-40 (2007); Lacy *et al.*, J Clin Oncol 26, 3196-203 (2008); Gualberto y Karp, Clin Lung Cancer 10, 273-80 (2009), el mAb IgG1 completamente humano SCH-717454 (descrito en el documento WO 2008/076257 o Kolb *et al.*, Pediatr Blood Cancer 50, 1190-7 (2008)), el mAb 2.13.2. (descrito en el documento US 7.037.498 (documento WO 2002/053596)) o el mAb IgG4 completamente humano B1B022.

Los anticuerpos anti-CEA específicos útiles en la presente invención son anticuerpos de clase IgG humanizados, que tienen la especificidad de unión del anticuerpo PR1A3 murino (Richman y Bodmer, Int J Cancer 39, 317-328 (1987)). En particular, es útil un anticuerpo anti-CEA de clase IgG humanizado, que comprende

a) en el dominio variable de la cadena pesada una CDR1 de SEQ ID NO: 108, una CDR2 de SEQ ID NO: 109 y una CDR3 de SEQ ID NO: 110, y

b) en el dominio variable de la cadena ligera una CDR1 de SEQ ID NO: 111, una CDR2 de SEQ ID NO: 112 y una CDR3 de SEQ ID NO: 113.

Un anticuerpo anti-CEA más particular que es útil en la invención comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 114 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 115.

Dichos anticuerpos anti-CEA se describen en la publicación de PCT número WO 2011/023787.

Los anticuerpos anti-HER3 específicos que son útiles en la presente invención son anticuerpos de clase IgG humanizados, tales como Mab 205.10.1, Mab 205.10.2 y Mab 205.10.3, en particular Mab 205.10.2, descritos en la publicación de PCT número de WO 2011/076683. En particular, es útil un anticuerpo anti-HER3 de clase IgG humanizado, que comprende

a) en el dominio variable de la cadena pesada una CDR1 de SEQ ID NO: 139, una CDR2 de SEQ ID NO: 140 y una CDR3 de SEQ ID NO: 141, y

b) en el dominio variable de la cadena ligera una CDR1 de SEQ ID NO: 143, una CDR2 de SEQ ID NO: 144 y una CDR3 de SEQ ID NO: 145.

Un anticuerpo anti-HER3 más particular que es útil en la invención comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 142 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 146.

Los anticuerpos anti-CDCP1 específicos que son útiles en la presente invención son anticuerpos de clase IgG humanizados derivados del anticuerpo CUB4 (número de depósito DSM ACC 2551 (DSMZ), como se describe en la publicación de PCT número WO 2011/023389).

Los anticuerpos anti-MCSP ejemplares que se pueden usar en la presente invención se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente europea número EP 11178393.2. En particular, es útil un anticuerpo anti-MCSP de clase IgG humanizado, que comprende

a) en el dominio variable de la cadena pesada una CDR1 de SEQ ID NO: 116, una CDR2 de SEQ ID NO: 117 y una CDR3 de SEQ ID NO: 118, y

b) en el dominio variable de la cadena ligera una CDR1 de SEQ ID NO: 119, una CDR2 de SEQ ID NO: 120 y una CDR3 de SEQ ID NO: 121.

Un anticuerpo anti-MCSP más particular que es útil en la invención comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 122 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 123.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa de la clase IgG. En un modo de realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En un modo de realización, el anticuerpo comprende una región Fc humana, más en particular una región Fc de IgG humana, lo más en particular una región Fc de IgG1 humana. Los anticuerpos útiles en la invención, tales como los anticuerpos anti-IGF-1R, anti-EGFR y anti-CD20 descritos anteriormente, pueden comprender una región constante de la cadena pesada gamma 1 de Ig humana, como se expone en SEQ ID NO: 124 (es decir, los anticuerpos son de la subclase IgG1 humana).

Los anticuerpos útiles en la presente invención se genomanipulan para que tengan una función efectora

incrementada, en comparación con un anticuerpo correspondiente no genomanipulado. En un modo de realización, el anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada tiene al menos 2 veces, al menos 10 veces o incluso al menos 100 veces la función efectora incrementada, en comparación con un anticuerpo no genomanipulado correspondiente. La función efectora incrementada puede incluir, pero no se limita a, una o más de las siguientes: unión al receptor de Fc incrementada, unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) incrementadas, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) incrementada, secreción de citocinas incrementada, captación de antígenos mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígenos incrementada, unión a linfocitos NK incrementada, unión a macrófagos incrementada, unión a monocitos incrementada, unión a células polimorfonucleares incrementada, señalización directa que induce apoptosis incrementada, reticulación de anticuerpos unidos a la diana incrementada, maduración de células dendríticas incrementada o activación de linfocitos T incrementada.

En un modo de realización, la función efectora incrementada es una o más seleccionadas del grupo de unión al receptor de Fc incrementada, CDC incrementada, ADCC incrementada, ADCP incrementada y secreción de citocinas incrementada. En un modo de realización, la función efectora incrementada es unión incrementada a un receptor de Fc activador. En un modo de realización de este tipo, la afinidad de unión al receptor de Fc activador se incrementa al menos 2 veces, en particular al menos 10 veces, en comparación con la afinidad de unión de un anticuerpo no genomanipulado correspondiente. En un modo de realización específico, el receptor de Fc activador se selecciona del grupo de FcγRIIIa, FcγRI y FcγRIIa. En un modo de realización, el receptor de Fc activador es FcγRIIIa, en particular FcγRIIIa humano. En otro modo de realización, la función efectora incrementada es una ADCC incrementada. En un modo de realización de este tipo, la ADCC se incrementa al menos 10 veces, en particular al menos 100 veces, en comparación con la ADCC mediada por un anticuerpo correspondiente no genomanipulado. En aún otro modo de realización, la función efectora incrementada es unión incrementada a un receptor de Fc activador y ADCC incrementada.

Se puede medir la función efectora incrementada por procedimientos conocidos en la técnica. Un ensayo adecuado para medir la ADCC se describe en el presente documento. Otros ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362; Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patente de EE. UU. n.º 5.821.337; Bruggemann *et al.*, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998). La unión a receptores de Fc se puede determinar fácilmente, por ejemplo, por ELISA, o por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores de Fc tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. De acuerdo con un modo de realización particular, la afinidad de unión a un receptor de Fc activador se mide por resonancia de plasmón superficial usando un aparato BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C. De forma alternativa, la afinidad de unión de los anticuerpos por los receptores de Fc se puede evaluar usando las líneas celulares conocidas por expresar receptores de Fc particulares, tales como linfocitos NK que expresan el receptor de FcγRIIIa. También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si el anticuerpo se puede unir a C1q y, de ahí que tenga actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg *et al.*, Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

La función efectora incrementada puede resultar, por ejemplo, de la glucomanipulación de la región Fc o de la introducción de mutaciones aminoacídicas en la región Fc del anticuerpo. En un modo de realización, el anticuerpo se genomanipula mediante la introducción de una o más mutaciones aminoacídicas en la región Fc. En un modo de realización específico, las mutaciones aminoacídicas son sustituciones aminoacídicas. En un modo de realización incluso más específico, las sustituciones aminoacídicas están en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos). Se describen otras mutaciones aminoacídicas adecuadas, por ejemplo, en Shields *et al.*, J Biol Chem 9(2), 6591-6604 (2001); la patente de EE. UU. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/063351 y el documento WO 2004/099249. Las regiones Fc mutantes se pueden preparar por delección, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis específica de sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios nucleotídicos correctos se pueden verificar, por ejemplo, por secuenciación.

En otro modo de realización, el anticuerpo se genomanipula mediante modificación de la glucosilación en la región Fc. En un modo de realización específico, el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. Una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc de un anticuerpo da como resultado que el anticuerpo tenga una función efectora incrementada, en particular una ADCC incrementada.

En un modo de realización más específico, al menos aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 55 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 100 %, preferentemente al menos aproximadamente un 50 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 70 %, de los oligosacáridos unidos a N en la región Fc del anticuerpo son no fucosilados. Los oligosacáridos no fucosilados pueden ser del tipo híbrido o complejo.

En otro modo de realización específico, el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos bisecados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. En un modo de realización más específico, al menos aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 55 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 100 %, preferentemente al menos aproximadamente un 50 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 70 %, de los oligosacáridos unidos a N en la región Fc del anticuerpo son bisecados. Los oligosacáridos bisecados pueden ser del tipo híbrido o complejo.

En aún otro modo de realización específico, el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos bisecados no fucosilados en la región Fc, en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. En un modo de realización más específico, al menos aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 55 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 100 %, preferentemente al menos aproximadamente un 15 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 35 % o al menos aproximadamente un 50 % de los oligosacáridos unidos a N en la región Fc del anticuerpo son bisecados, no fucosilados. Los oligosacáridos bisecados no fucosilados pueden ser del tipo híbrido o complejo.

Las estructuras de oligosacáridos en la región Fc del anticuerpo se pueden analizar por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante espectrometría de masas MALDI TOF como se describe en Umana *et al.*, Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999) o Ferrara *et al.*, Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006). El porcentaje de oligosacáridos no fucosilados es la cantidad de oligosacáridos que carecen de residuos de fucosa, en relación con todos los oligosacáridos unidos a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido en manosa) e identificados en una muestra tratada con N-glucosidasa F por EM MALDI TOF. Asn 297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn 297 también se puede localizar aproximadamente ± 3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia insignificantes en los anticuerpos. El porcentaje de oligosacáridos bisecados o bisecados no fucosilados se determina de forma análoga.

En un modo de realización, el anticuerpo se genomanipula para que tenga glucosilación modificada en la región Fc, en comparación con un anticuerpo no genomanipulado, produciendo el anticuerpo en una célula huésped que tiene actividad alterada de una o más glucosiltransferasas. Las glucosiltransferasas incluyen β -(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), β -(1,4)-galactosiltransferasa (GalT), β -(1,2)-N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI), β -(1,2)-N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnTII) y α -(1,6)-fucosiltransferasa. En un modo de realización específico, el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc, en comparación con un anticuerpo no genomanipulado, produciendo el anticuerpo en una célula huésped que tiene una actividad β -(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII) incrementada. En un modo de realización incluso más específico, la célula huésped tiene adicionalmente actividad α -manosidasa II (ManII) incrementada. La metodología de la glucomanipulación que se puede usar para genomanipular anticuerpos útiles para la presente invención se ha descrito con mayor detalle en Umana *et al.*, Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999); Ferrara *et al.*, Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006); el documento WO 99/54342 (patente de EE. UU. n.º 6.602.684; documento EP 1071700); el documento WO 2004/065540 (publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0241817; documento EP 1587921), el documento WO 03/011878 (publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0175884). Los anticuerpos glucomanipulados que usan esta metodología se denominan GlycoMab en el presente documento.

En general, se puede usar cualquier tipo de línea celular cultivada, incluyendo las líneas celulares analizadas en el presente documento, para generar líneas celulares para la producción de anticuerpos anti-TNC A2 con un patrón de glucosilación alterado. Las líneas celulares particulares incluyen células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de

hibridoma, y otras células de mamífero. En determinados modos de realización, las células huésped se han manipulado para expresar niveles incrementados de uno o más polipéptidos que tienen actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII). En determinados modos de realización, las células huésped se han manipulado adicionalmente para expresar niveles incrementados de uno o más polipéptidos que tienen actividad α -manosidasa II (ManII). En un modo de realización específico, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización de Golgi de un polipéptido heterólogo residente en Golgi. En particular, dicho dominio de localización de Golgi es el dominio de localización de Golgi de manosidasa II. Los procedimientos para generar dichos polipéptidos de fusión y usarlos para producir anticuerpos con funciones efectoras incrementadas se divulgan en Ferrara *et al.*, *Biotechn Bioeng* 93, 851-861 (2006) y el documento WO 2004/065540.

Las células huésped que contienen la secuencia codificante de un anticuerpo útil para la invención y/o la secuencia codificante de polipéptidos que tienen actividad glucosiltransferasa, y que expresan los productos génicos biológicamente activos, se pueden identificar, por ejemplo, por hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN; la presencia o ausencia de funciones génicas "marcadoras"; evaluando el nivel de transcripción medido por la expresión de los respectivos transcritos de ARNm en la célula huésped; o la detección del producto génico medido por inmunoensayo o por su actividad biológica; procedimientos que son bien conocidos en la técnica. La actividad GnTIII o ManII se puede detectar, por ejemplo, empleando una lectina que se une a productos de biosíntesis de GnTIII o ManII, respectivamente. Un ejemplo para dicha lectina es la lectina E4-PHA que se une preferentemente a oligosacáridos que contienen GlcNAc bisecante. Los productos de biosíntesis (es decir, estructuras de oligosacáridos específicas) de polipéptidos que tienen actividad GnTIII o ManII también se pueden detectar mediante análisis de espectrometría de masas de los oligosacáridos liberados a partir de glucoproteínas producidas por células que expresan dichos polipéptidos. De forma alternativa, se puede usar un ensayo funcional que mide la función efectora incrementada, por ejemplo, la unión al receptor de Fc incrementada, mediada por anticuerpos producidos por las células genomanipuladas con el polipéptido que tiene actividad GnTIII o ManII.

En otro modo de realización, el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc, en comparación con un anticuerpo no genomanipulado, produciendo el anticuerpo en una célula huésped que tiene actividad $\alpha(1,6)$ -fucosiltransferasa disminuida. Una célula huésped que tiene actividad $\alpha(1,6)$ -fucosiltransferasa disminuida puede ser una célula en la que el gen de la $\alpha(1,6)$ -fucosiltransferasa se ha inactivado o desactivado de otro modo, por ejemplo, se ha suprimido (véase Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotech Bioeng* 87, 614 (2004); Kanda *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 94(4), 680-688 (2006); Niwa *et al.*, *J Immunol Methods* 306, 151-160 (2006)).

Otros ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.*, *Arch Biochem Biophys* 249, 533-545 (1986); solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0157108 y el documento WO 2004/056312, especialmente en el ejemplo 11). Los anticuerpos útiles en la presente invención, de forma alternativa, se pueden genomanipular para que tengan residuos de fucosa reducida en la región Fc de acuerdo con las técnicas divulgadas en los documentos EP 1 176 195 A1, WO 03/084570, WO 03/085119 y las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0115614, 2004/093621, 2004/110282, 2004/110704, 2004/132140, la patente de EE. UU. n.º 6.946.292 (Kyowa), por ejemplo, reduciendo o suprimiendo la actividad de una proteína transportadora de GDP-fucosa en las células huésped usadas para la producción de anticuerpos.

Los anticuerpos glucomanipulados útiles en la invención también se pueden producir en sistemas de expresión que producen glucoproteínas modificadas, tales como las enseñadas en el documento WO 03/056914 (GlycoFi, Inc.) o en los documentos WO 2004/057002 y WO 2004/024927 (Greenovation).

Procedimientos recombinantes

Los procedimientos para producir anticuerpos e inmunoconjugados útiles en la invención se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2012/146628, WO 2005/044859, WO 2006/082515, WO 2008/017963, WO 2005/005635, WO 2008/077546, WO 2011/023787, WO 2011/076683, WO 2011/023389 y WO 2006/100582. También se describen los procedimientos establecidos para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, por ejemplo, en Harlow y Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Los anticuerpos no naturales o fragmentos de los mismos se pueden construir usando síntesis de péptidos en fase sólida, se pueden producir de manera recombinante (por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567) o se pueden obtener, por ejemplo, seleccionando colecciones combinatorias que comprenden cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.969.108 para McCafferty). Para la producción recombinante de inmunoconjugados y anticuerpos útiles en la invención, se aíslan uno o más polinucleótidos que codifican dicho inmunoconjugado o anticuerpo y se insertan en uno o más vectores para su posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Dichos polinucleótidos se pueden aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales. Los procedimientos, que se conocen bien por los expertos en la técnica, se pueden usar para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante

de un anticuerpo o inmunoconjugado junto con señales de control de la transcripción/traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) y Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989).

Los inmunoconjugados útiles en la invención se pueden expresar a partir de un único polinucleótido que codifica el inmunoconjugado completo o a partir de múltiples (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos que se coexpresan. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se coexpresan se pueden asociar, por ejemplo, a través de enlaces disulfuro u otros medios para formar un inmunoconjugado funcional. Por ejemplo, la porción de la cadena ligera de un anticuerpo se puede codificar por un polinucleótido separado de la porción del inmunoconjugado que comprende la porción de la cadena pesada del anticuerpo y el resto efector. Cuando se coexpresen, los polipéptidos de la cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de la cadena ligera para formar el anticuerpo.

Las células huésped adecuadas para replicar y para soportar la expresión de proteínas recombinantes se conocen bien en la técnica. Dichas células se pueden transfectar o transducir según sea apropiado con el vector de expresión particular y se pueden cultivar grandes cantidades de células que contienen vectores para sembrar fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes de las proteínas, por ejemplo, para aplicaciones clínicas. Las células huésped adecuadas incluyen microorganismos procariotas, tales como *E. coli*, o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto o similares. Por ejemplo, las proteínas recombinantes se pueden producir en bacterias, en particular cuando no se necesita la glucosilación. Después de la expresión, la proteína se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente. Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican proteínas, incluyendo cepas de hongos y levaduras en las que sus vías de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de una proteína con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004), y Li *et al.*, Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Las células huésped adecuadas para la expresión de proteínas (glucosiladas) también derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar conjuntamente con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.959.177; 6.040.498; 6.420.548; 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en vegetales transgénicos). También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adaptan para cultivar en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (HEK) (células 293 o 293T como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, J Gen Virol 36, 59 (1977)), células de riñón de crías de hámster (BHK), células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor de mama de ratón (MMT 060562), células TRI (como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), células MRC-5 y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO-DHFR⁻ (Urlaub *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003). Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado. En un modo de realización, la célula huésped es una célula eucariota, en particular una célula de mamífero, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula 293 de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfática (por ejemplo, una célula Y0, NS0, Sp20).

Si el anticuerpo y el inmunoconjugado están destinados para uso humano, se pueden usar formas quiméricas de anticuerpos en las que las regiones constantes del anticuerpo proceden de un ser humano. También se puede preparar una forma humanizada o totalmente humana del anticuerpo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.565.332 para Winter). La humanización se puede lograr mediante diversos procedimientos incluyendo, pero sin limitarse a, (a) injertar las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en regiones estructurales y constantes humanas (por ejemplo, anticuerpo receptor) con o sin retención de residuos estructurales cruciales (por ejemplo, los que son importantes para conservar buenas funciones de afinidad de unión a antígeno o de anticuerpo), (b) injertar solo las regiones determinantes de la especificidad (SDR o a-CDR; los residuos cruciales para la interacción anticuerpo-antígeno) no humanas en regiones estructurales y constantes humanas, o (c) trasplantar todos los dominios variables no humanos, pero "enmascararlos" con una sección similar a humana mediante el reemplazo de residuos superficiales. Los anticuerpos humanizados y procedimientos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, Front Biosci 13,

1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, Nature 332, 323-329 (1988); Queen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); las patentes de EE. UU. n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Jones *et al.*, Nature 321, 522-525 (1986); Morrison *et al.*, Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv Immunol 44, 65-92 (1988); Verhoeven *et al.*, Science 239, 1534-1536 (1988); Padlan, Molec Immun 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri *et al.*, Methods 36, 25-34 (2005) (que describen un injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, Mol Immunol 28, 489-498 (1991) (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua *et al.*, Methods 36, 43-60 (2005) (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn *et al.*, Methods 36, 61-68 (2005) y Klimka *et al.*, Br J Cancer 83, 252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" al reordenamiento de FR). Se pueden producir anticuerpos humanos y regiones variables humanas usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen en general en van Dijk y van de Winkel, Curr Opin Pharmacol 5, 368-74 (2001) y Lonberg, Curr Opin Immunol 20, 450-459 (2008). Las regiones variables humanas pueden formar parte de y derivarse de anticuerpos monoclonales humanos preparados por el procedimiento de hibridoma (véase, por ejemplo, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). También se pueden preparar anticuerpos humanos y regiones variables humanas administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para que produzca anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigénica (véase, por ejemplo, Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005)). También se pueden generar anticuerpos humanos y regiones variables humanas aislando secuencias de regiones variables de clones de Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de humano (véase, por ejemplo, Hoogenboom *et al.* en Methods in Molecular Biology 178, 1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); y McCafferty *et al.*, Nature 348, 552-554; Clackson *et al.*, Nature 352, 624-628 (1991)). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab.

En determinados modos de realización, los anticuerpos útiles en la presente invención se genomanipulan para que tengan una afinidad de unión potenciada de acuerdo con, por ejemplo, los procedimientos divulgados en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2004/0132066. La capacidad de los anticuerpos útiles en la invención para unirse a un determinante antigénico específico se puede medir a través de un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas familiares para un experto en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (analizada en un sistema BIACORE T100) (Liljeblad *et al.*, Glyco J17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)).

Los anticuerpos e inmunoconjugados preparados como se describe en el presente documento se pueden purificar mediante técnicas conocidas en la técnica tales como cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores tales como carga neta, hidrofobia, hidrofilia, etc., y serán evidentes para los expertos en la técnica.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas se pueden usar, por ejemplo, en cualquiera de los procedimientos terapéuticos descritos a continuación.

Las composiciones farmacéuticas de un inmunoconjugado y un anticuerpo que tienen una función efectora incrementada como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho inmunoconjugado y anticuerpo que tienen el grado de pureza deseado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 18.^a edición, Mack Printing Company (1990)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, no son tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glucoproteínas hialuronidasas activas a pH neutro solubles (SHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas hialuronidasas a pH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinadas SHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una SHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como

condroitinasas.

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

La composición farmacéutica del presente documento también puede contener ingredientes activos adicionales según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, en particular aquellos con actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. Por ejemplo, si la enfermedad que se va a tratar es cáncer, puede ser deseable proporcionar además uno o más agentes antineoplásicos, por ejemplo, un agente quimioterápico, un inhibidor de la proliferación de células tumorales o un activador de la apoptosis de células tumorales. Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Se pueden atrapar ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 18.^a edición, Mack Printing Company (1990).

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las composiciones que se van a usar para su administración *in vivo* son, en general, estériles. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Procedimientos de tratamiento

Se puede usar la combinación proporcionada en el presente documento de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, en procedimientos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, para su uso como medicamento. En otros aspectos, se proporciona una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En determinados modos de realización, se proporciona una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, para su uso en un procedimiento de tratamiento. En determinados, la invención proporciona una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la combinación. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. En otros modos de realización, la invención proporciona una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, para su uso en la estimulación de la función de las células efectoras. En determinados modos de realización, la invención proporciona una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, para su uso en un procedimiento de estimulación de la función de las células efectoras en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la combinación para estimular la función de las células efectoras. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un mamífero, en particular un ser humano. Una "enfermedad" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es una enfermedad tratable mediante la estimulación de la función de las células efectoras. En determinados modos de realización, la enfermedad es un trastorno de proliferación celular, en particular cáncer.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, en la fabricación o

preparación de un medicamento. En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad. En otro modo de realización, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un individuo que tiene la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. En otro modo de realización, el medicamento es para estimular la función de las células efectoras. En otro modo de realización, el medicamento es para su uso en un procedimiento de estimulación de la función de las células efectoras en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad del medicamento eficaz para estimular la función de las células efectoras. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un mamífero, en particular un ser humano. Una "enfermedad" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es una enfermedad tratable mediante la estimulación de la función de las células efectoras. En determinados modos de realización, la enfermedad es un trastorno de proliferación celular, en particular cáncer.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad. En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene dicha enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe a continuación. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un mamífero, en particular un ser humano. Una "enfermedad" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es una enfermedad tratable mediante la estimulación de la función de las células efectoras. En determinados modos de realización, la enfermedad es un trastorno de proliferación celular, en particular cáncer.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para estimular la función de las células efectoras en un individuo. En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una combinación de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, para estimular la función de las células efectoras. En un modo de realización, un "individuo" es un mamífero, en particular un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las combinaciones de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada proporcionada en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un modo de realización, una composición farmacéutica comprende una combinación proporcionada en el presente documento, de (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las combinaciones proporcionadas en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

De acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores, la enfermedad es un trastorno tratable mediante la estimulación de la función de las células efectoras. Las combinaciones de la invención son útiles en el tratamiento de estados de enfermedad donde la estimulación del sistema inmunitario del huésped es beneficiosa, en condiciones particulares donde es deseable una respuesta inmunitaria celular potenciada. Estas pueden incluir estados de enfermedad donde la respuesta inmunitaria del huésped es insuficiente o deficiente. Los estados de enfermedad para los que se pueden administrar las combinaciones de la invención comprenden, por ejemplo, un tumor o infección donde una respuesta inmunitaria celular sería un mecanismo crucial para la inmunidad específica. Los estados de enfermedad específicos para los que se pueden emplear las combinaciones de la presente invención incluyen cáncer, específicamente carcinoma de células renales o melanoma; inmunodeficiencia, específicamente en pacientes infectados por VIH, pacientes inmunodeprimidos, infección crónica y similares. En determinados modos de realización, la enfermedad es un trastorno de proliferación celular. En un particular, la enfermedad es cáncer, específicamente un cáncer seleccionado del grupo de cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia, cáncer de piel.

Las combinaciones de la invención se pueden usar solas o bien conjuntamente con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, una combinación de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. En determinados modos de realización, un agente terapéutico adicional es un agente antineoplásico, por ejemplo, un agente quimioterápico, un inhibidor de la proliferación de células tumorales o un activador de la apoptosis de células tumorales.

Las politerapias como se proporciona en el presente documento engloban la administración del anticuerpo y el

inmunoconjugado conjuntamente (donde se incluyen los dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y por separado, en cuyo caso, la administración del anticuerpo se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del inmunoconjugado, agente terapéutico y/o adyuvante adicionales. Las combinaciones de la invención también se pueden combinar con radioterapia.

Una combinación de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier vía adecuada, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. El anticuerpo y el inmunoconjugado se pueden administrar por la misma vía o por vías diferentes. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos momentos, administración en bolo e infusión intermitente.

Las combinaciones de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de una forma consistente con las prácticas médicas correctas. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración de los agentes, el procedimiento de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos. Aunque no se necesita, la combinación se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo e inmunoconjugado presentes en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y con las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de enfermedades, la dosificación apropiada de un anticuerpo e inmunoconjugado (cuando se usan en las combinaciones de la invención, opcionalmente conjuntamente con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo e inmunoconjugado, de la gravedad y la evolución de la enfermedad, ya sea que la combinación se administre para propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis del paciente y de la respuesta al anticuerpo y/o inmunoconjugado, y del criterio del médico adjunto. El anticuerpo y el inmunoconjugado se administran adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, en general, se prolongaría el tratamiento hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis inicial mayor de carga, seguida de una o más dosis menores. Una pauta posológica ejemplar comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Las mismas consideraciones con respecto a la dosificación se aplican al inmunoconjugado que se va a usar en las combinaciones de acuerdo con la invención. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. La progresión de este tratamiento se sigue fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende uno o más recipientes y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que por sí misma o combinada con otra composición es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo que se va a usar en las combinaciones de la invención. Otro agente activo es el inmunoconjugado que se va a usar en las combinaciones de la invención, que puede estar en la misma composición y recipiente, como el anticuerpo, o que se puede proporcionar en una composición y recipiente diferentes. La ficha técnica o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección.

En un aspecto, la invención proporciona un kit destinado al tratamiento de una enfermedad, que comprende en el mismo recipiente o en recipientes separados (a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, y (b) un segundo anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada, y que comprende además opcionalmente (c) un prospecto del envase que comprende instrucciones impresas que indican el uso del tratamiento combinado como un procedimiento para tratar la enfermedad. Además, el kit puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora incrementada; (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector; y opcionalmente (c) un tercer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende otro agente citotóxico o de otro modo terapéutico. El kit en este modo de realización de la invención puede comprender además un prospecto del envase que indique que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el kit puede comprender además un tercer (o cuarto) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Ejemplos

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

Procedimientos generales

La glucomanipulación de la región Fc de un anticuerpo da lugar a una afinidad de unión incrementada a los receptores FcγRIII humanos, lo que a su vez se traduce en una inducción de ADCC potenciada y una eficacia antitumoral. Los receptores FcγRIII humanos se expresan en macrófagos, neutrófilos y linfocitos citolíticos naturales (NK), células dendríticas y linfocitos T γδ. En el ratón, la especie más ampliamente utilizada para pruebas de eficacia preclínica, FcγRIV murino, el homólogo murino de FcγRIIIa humano, está presente en los macrófagos y neutrófilos pero no en los linfocitos NK. Por lo tanto, no se refleja la magnitud total de cualquier eficacia mejorada esperada con anticuerpos glucomodificados en esos modelos. Se generó un ratón transgénico para FcγRIIIa humano (CD16a), que presenta la expresión de CD16a humano estable en linfocitos NK murinos en sangre, tejidos linfáticos y tumores. Además, el nivel de expresión de CD16a humano en linfocitos NK no estimulados en la sangre de estos ratones transgénicos refleja el encontrado en seres humanos. También se demostró que una regulación por disminución de FcγRIIIa humano en los linfocitos NK asociados a tumores después del tratamiento con anticuerpos se correlaciona con la actividad antitumoral. Por último, se demostró una eficacia significativamente mejorada del tratamiento con anticuerpos glucomodificados en modelos tumorales usando esta nueva cepa de ratón en comparación con sus compañeros de camada negativos para CD16 humano.

Ejemplo 1

Modelo de xenoinjerto de carcinoma de cabeza y cuello FaDu

Se sometieron a prueba los inmunoconjugados IgG-IL2 28H1 dirigido a FAP e IgG-IL2 DP47GS no dirigido que comprendían la IL-2 mutante cuádruple (qm) (SEQ ID NO: 125, 126, 129 y SEQ ID NO: 133-135, respectivamente) y el GlycoMab anti-EGFR (SEQ ID NO: 102 y 103) en la línea celular de carcinoma de cabeza y cuello humana FaDu, inyectada por vía intralingual en ratones SCID. La IHQ demostró que este modelo tumoral en tejido congelado en fresco era positivo para FAP. Las células FaDu se obtuvieron originalmente de la ATCC (American Type Culture Collection) y después de la expansión se depositaron en el banco de células interno de Glycart. La línea de células tumorales se cultivó de forma rutinaria en DMEM que contenía FCS al 10 % (Gibco) a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO₂ al 5 %. Se usó el paso 9 *in vitro* para inyección intralingual, con una viabilidad de un 95,8 %. Se inyectaron por vía intralingual veinte µl de suspensión celular (2 x 10⁵ células FaDu en medio AimV (Gibco)). Ratones hembra SCID (Taconics, Dinamarca), de 8-9 semanas de edad al inicio del experimento se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las directrices acordadas (GV-Solas, Felasa, TierschG). Se revisó el protocolo de estudio experimental y se aprobó por el gobierno local (P 2008016). Después de su llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento de salud continuo de forma periódica. A los ratones se les inyectaron por vía intralingual el día 0 del estudio 2 x 10⁵ células FaDu, se aleatorizaron y se pesaron. Una semana después de la inyección de células tumorales, a los ratones se les inyectó i.v. el inmunoconjugado IgG-IL2 qm 28H1, el inmunoconjugado IgG-IL2 qm DP47GS, el GlycoMab anti-EGFR, la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm 28H1 y el GlycoMab anti-EGFR o la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm DP47GS y el GlycoMab anti-EGFR una vez a la semana durante cuatro semanas. A todos los ratones se les inyectaron i.v. 200 µl de la solución apropiada. Las dosis se especifican en la tabla 2. A los ratones en el grupo de vehículo se les inyectó PBS y en los grupos de tratamiento el

inmunoconjugado IgG-IL2 qm 28H1, el inmunoconjugado IgG-IL2 qm DP47GS, el GlycoMab anti-EGFR, la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm 28H1 y el GlycoMab anti-EGFR o la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm DP47GS y el GlycoMab anti-EGFR. Para obtener la cantidad apropiada de inmunoconjugado por 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con PBS cuando fue necesario. La figura 1A muestra que solo la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm 28H1 dirigido a FAP y el GlycoMab anti-EGFR mediaron una eficacia superior en términos de la mediana de supervivencia potenciada en comparación con el inmunoconjugado IgG-IL2 qm 28H1 o el GlycoMab anti-EGFR solos. Por el contrario, la combinación de IgG-IL2 qm DP47GS no dirigido y el GlycoMab anti-EGFR no mostró superioridad con respecto a la administración del agente único (figura 1B).

TABLA 2.

Compuesto	Dosis/ratón	Tampón de formulación	Concentración (mg/ml)
GlycoMab anti-EGFR	625 µg	His/HisCl 20 mM Trehalosa 240 mM Polisorbato 80 al 0,02 % Metionina 10 mM pH 5,5	26,65 (= solución madre)
IgG-IL2 qm 28H1 dirigido a FAP	50 µg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	3,46 (= solución madre)
IgG-IL2 qm DP47GS no dirigido	50 µg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	5,87 (= solución madre)

Ejemplo 2

Refuerzo *in vitro* de la capacidad de destrucción de linfocitos NK por inmunoconjugados de IL-2

Para determinar el efecto de los inmunoconjugados sobre los linfocitos NK, se evaluó la destrucción de células tumorales tras el tratamiento con los inmunoconjugados, en particular inmunoconjugados que comprenden IL-2 como resto efector. Para este propósito, se aislaron linfocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) de acuerdo con procedimientos estándar, usando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO, EE. UU.). En resumen, se extrajo sangre venosa con jeringuillas heparinizadas a voluntarios sanos. La sangre se diluyó 2:1 con PBS que no contenía calcio ni magnesio y se extendió sobre Histopaque-1077. El gradiente se centrifugó a 450 x g durante 30 min a temperatura ambiente (TA) sin frenado. La interfase que contiene los PBMC se recogió y se lavó con PBS tres veces en total (350 x g seguido de 300 x g durante 10 min a TA).

Los PBMC aislados se incubaron con inmunoconjugados de IL-2 (Proleukin) o IL-2, añadidos al sobrenadante celular, durante 45 h. Posteriormente, los PBMC se recuperaron y se usaron para ADCC mediada por GlycoMab anti-EGFR de células A549 a una E:T de 10:1, durante 4 h. La destrucción de las células diana se detectó midiendo la liberación de LDH en los sobrenadantes celulares (kit de detección de citotoxicidad con LDH de Roche). La figura 2 muestra la destrucción global de células tumorales A549 por los PBMC, pretratados o no con inmunoconjugado IgG-IL2 qm 28H1 dirigido a FAP o IL-2 (Proleukin) 0,57 nM (A) o 5,7 nM (B), en presencia de diferentes concentraciones de GlycoMab anti-EGFR. Los gráficos muestran que el pretratamiento con inmunoconjugado de las células efectoras da como resultado un incremento mayor en la destrucción de las células diana con concentraciones en incremento de GlycoMab, en comparación con las células efectoras no tratadas.

Ejemplo 3

Modelo de xenoinjerto colorrectal LS174T

El inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A dirigido a CEA (SEQ ID NO: 136-138), el GlycoMab anti-EGFR (SEQ ID NO: 102 y 103) y cetuximab se sometieron a prueba en la línea celular LS174T colorrectal humana, inyectada por vía intraesplénica en ratones SCID transgénicos para FcγRIII humano. La IHQ demostró que este modelo tumoral en tejido congelado en fresco era positivo para CEA. Las células LS174T (células de carcinoma de colon humano) se obtuvieron originalmente de la ECACC (European Collection of Cell Culture) y después de la expansión se depositaron en el banco de células interno de Glycart. LS174T se cultivaron en medio de Eagle MEM que contenía FCS al 10 % (PAA Laboratories, Austria), Glutamax al 1 % y aminoácidos no esenciales MEM al 1 % (Sigma). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO₂ al 5 %. Se usó el paso 19 o 23 *in vitro* para inyección intraesplénica, con una viabilidad de un 99 %. Se realizó una pequeña incisión en el sitio abdominal izquierdo de los ratones SCID transgénicos para FcγRIII anestesiados. Se inyectaron treinta microlitros de suspensión celular (2 x 10⁶ células LS174T en medio AIM V) a través de la pared abdominal justo debajo de la cápsula del bazo. Las heridas superficiales se cerraron usando pinzas de forcipresión o suturas resolubles. Ratones SCID hembra transgénicos para FcγRIII; de 8-9 semanas de edad al inicio del experimento (adquiridos a Taconi,

Dinamarca) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las directrices acordadas (GV-Solas, Felasa, TierschG). Se revisó y aprobó el protocolo del estudio experimental por las autoridades gubernamentales locales (P 2008016, P2011/128). Después de su llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento de salud continuo de forma periódica. A los ratones se les inyectaron por vía intraesplénica el día 0 del estudio 2×10^6 células LS174T, se aleatorizaron y se pesaron. Una semana después de la inyección de células tumorales, a los ratones se les inyectó i.v. el inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A, el GlycoMab anti-EGFR, cetuximab, la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y el GlycoMab anti-EGFR o la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y cetuximab una vez a la semana durante tres semanas. A todos los ratones se les inyectaron i.v. 200 µl de la solución apropiada. Las dosis se especifican en la tabla 3. A los ratones en el grupo de vehículo se les inyectó PBS y en los grupos de tratamiento el inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A o el GlycoMab anti-EGFR, cetuximab, la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y el GlycoMab anti-EGFR o la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y cetuximab. Para obtener la cantidad apropiada de inmunoconjugado por 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con PBS cuando fue necesario. La figura 3 y las tablas 3A y 3B muestran que la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y el GlycoMab anti-EGFR mediaron una eficacia superior en términos de la mediana de supervivencia y supervivencia global potenciadas en comparación con el inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A solo, el GlycoMab anti-EGFR solo, cetuximab solo, o la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y cetuximab.

TABLA 3.

Compuesto	Dosis/ratón	Tampón de formulación	Concentración (mg/ml)
GlycoMab anti-EGFR	500 µg	His/HisCl 20 mM Trehalosa 240 mM Tween 20 al 0,02 % pH 6,0	25,3 (= solución madre)
IgG-IL2 qm CH1A1A	40 µg (fig. 3A) o 20 µg (fig. 3B)	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	4,27 (= solución madre)
Cetuximab	500 µg	Citrato de sodio 10 mM, NaCl, glicina, Tween 80, pH 5,5	4,36 (= solución madre)

TABLA 3A. Resumen de los datos de supervivencia correspondientes a la figura 3A.

Tratamiento	Mediana de la supervivencia (días)	Supervivencia global
Vehículo	24	0/8
IgG-IL2 qm CH1A1A	33	0/8
GlycoMab anti-EGFR	40	0/8
IgG-IL2 qm CH1A1A + GlycoMab anti-EGFR	141	3/8

TABLA 3B. Resumen de los datos de supervivencia correspondientes a la figura 3B.

Tratamiento	Mediana de la supervivencia (días)	Supervivencia global
Vehículo	29	0/8
IgG-IL2 qm CH1A1A	35	0/8
Cetuximab	39	0/8
IgG-IL2 qm CH1A1A + cetuximab	53 (en curso)	2/8 (en curso)

Ejemplo 4

Modelo de xenoinjerto pulmonar A549

El inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A dirigido a CEA (SEQ ID NO: 136-138), el GlycoMab anti-EGFR (SEQ ID NO: 102 y 103) y cetuximab se sometieron a prueba en la línea celular A549 de NSCLC humano, inyectada i.v. en ratones SCID transgénicos para FcγRIII humano.

Las células del carcinoma broncopulmonar no microcítico A549 se obtuvieron originalmente de la ATCC (CCL-185) y después de la expansión se depositaron en el banco de células interno de Roche-Glycart. La línea de células tumorales se cultivó de forma rutinaria en DMEM que contenía FCS al 10 % (Gibco) a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO₂ al 5 %. Se usó el paso 8 para trasplante, con una viabilidad de un 97-98 %. Se inyectaron i.v. 5 x 10⁶ células por animal en la vena de la cola en 200 µl de medio de cultivo celular AIM V (Gibco).

Ratones hembra SCID con FcγRIII (Roche-Glycart; Suiza), de 8-9 semanas de edad al inicio del experimento (criados en Charles River, Lyon, Francia) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las directrices acordadas (GV-Solas, Felasa, TierschG). Se revisó y aprobó el protocolo del estudio experimental por las autoridades gubernamentales locales (P 2011/128). Después de su llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento de salud continuo de forma periódica.

A los ratones se les inyectaron i.v. el día 0 del estudio 5 x 10⁶ células A549, se aleatorizaron y se pesaron. Una semana (figura 4A) o dos semanas (figura 4B) después de la inyección de las células tumorales, a los ratones se les inyectó i.v. el inmunoc conjugado IgG-IL2 qm CH1A1A, el GlycoMab anti-EGFR, cetuximab, la combinación del inmunoc conjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y el GlycoMab anti-EGFR o la combinación del inmunoc conjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y cetuximab una vez a la semana durante tres semanas. A todos los ratones se les inyectaron i.v. 200 µl de la solución apropiada. Las dosis se especifican en la tabla 4. A los ratones en el grupo de vehículo se les inyectó PBS y en el grupo de tratamiento el inmunoc conjugado IgG-IL2 qm CH1A1A, el GlycoMab anti-EGFR, la combinación del inmunoc conjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y el GlycoMab anti-EGFR o la combinación del inmunoc conjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y cetuximab. Para obtener la cantidad apropiada de inmunoc conjugado por 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con PBS cuando fue necesario.

La figura 4 y las tablas 4A y 4B muestran que la combinación del inmunoc conjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y el GlycoMab anti-EGFR media una eficacia superior en términos de mediana de supervivencia y supervivencia global potenciadas en comparación con el inmunoc conjugado respectivo, el GlycoMab anti-EGFR o el cetuximab solo, así como la combinación del inmunoc conjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y cetuximab.

TABLA 4.

Compuesto	Dosis	Tampón de formulación	Concentración (mg/ml)
IgG-IL2 qm CH1A1A	20 µg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	4,27 (= solución madre)
GlycoMab anti-EGFR	500 µg	His/HisCl 20 mM, Trehalosa 240 mM, Tween 20 al 0,02 %, pH 6,0	25,3 (= solución madre)
Cetuximab	500 µg	Citrato de sodio 10 mM, NaCl, glicina, Tween 80, pH 5,5	4,36 (= solución madre)

TABLA 4A. Resumen de los datos de supervivencia correspondientes a la figura 4A.

Tratamiento	Mediana de la supervivencia (días)	Supervivencia global
Vehículo	53	0/9
IgG-IL2 qm CH1A1A	103	0/9
GlycoMab anti-EGFR	211	2/9
IgG-IL2 qm CH1A1A + GlycoMab anti-EGFR	no alcanzado	9/9

TABLA 4B. Resumen de los datos de supervivencia correspondientes a la figura 4B.

Tratamiento	Mediana de la supervivencia (días)	Supervivencia global
Vehículo	49	0/10
IgG-IL2 qm CH1A1A	64	0/10
Cetuximab	68	0/10
IgG-IL2 qm CH1A1A + cetuximab	91	0/10

Ejemplo 5**Modelo de xenoinjerto colorrectal LS174T**

5 El inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A dirigido a CEA (SEQ ID NO: 136-138) y el GlycoMab anti-Her3 (SEQ ID NO: 142 y 146) se sometieron a prueba en la línea celular LS174T colorrectal humana, inyectada por vía intraesplénica en ratones SCID transgénicos para FcγRIII humano.

10 Las células LS174T (células de carcinoma de colon humano) se obtuvieron originalmente de la ECACC (European Collection of Cell Culture) y después de la expansión se depositaron en el banco de células interno de Roche-Glycart. LS174T se cultivaron en medio de Eagle MEM que contenía FCS al 10 % (PAA Laboratories, Austria), Glutamax al 1 % y aminoácidos no esenciales MEM al 1 % (Sigma). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO₂ al 5%. Se usó el paso 21 *in vitro* para inyección intraesplénica, con una viabilidad de un 97,9 %. Se realizó una pequeña incisión en el sitio abdominal izquierdo de los ratones SCID

15 transgénicos para FcγRIII humano anestesiados. Se inyectaron treinta microlitros (2 x 10⁶ células LS174T en medio AIM V) de suspensión celular a través de la pared abdominal justo debajo de la cápsula del bazo. Las heridas superficiales se cerraron usando suturas resolubles.

20 Ratones SCID hembra transgénicos para FcγRIII humano; de 8-9 semanas de edad al inicio del experimento (Roche-Glycart, Suiza) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las directrices acordadas (GV-Solas, Felasa, TierschG). Se revisó y aprobó el protocolo del estudio experimental por las autoridades gubernamentales locales (P 2011/128). Después de su llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento de salud continuo de forma periódica.

25 A los ratones se les inyectaron por vía intraesplénica el día 0 del estudio 2 x 10⁶ células LS174T, se aleatorizaron y se pesaron. Una semana después de la inyección de células tumorales, a los ratones se les inyectó i.v. el inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A, el GlycoMab anti-Her3 o la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y el GlycoMab anti-Her3 una vez a la semana durante tres semanas.

30 A todos los ratones se les inyectaron i.v. 200 µl de la solución apropiada. Las dosis se especifican en la tabla 5. A los ratones del grupo de vehículo se les inyectó PBS y en los grupos de tratamiento el inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A, el GlycoMab anti-Her3 o la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y el GlycoMab anti-Her3. Para obtener la cantidad apropiada de inmunoconjugado por 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con PBS cuando fue necesario. La figura 5 y la tabla 5A muestran que la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A y el GlycoMab anti-Her3 mediaba una eficacia superior en términos de la mediana de supervivencia

35 potenciada en comparación con el inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A o el GlycoMab anti-Her3 solo.

TABLA 5.

Compuesto	Dosis	Tampón de formulación	Concentración (mg/ml)
GlycoMab anti-Her3	200 µg		10,0 (= solución madre)
IgG-IL2 qm CH1A1A	20 µg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	13,60 (= solución madre)

TABLA 5A. Resumen de los datos de supervivencia correspondientes a la figura 5.

Tratamiento	Mediana de la supervivencia (días)	Supervivencia global
Vehículo	24	0/10
IgG-IL2 qm CH1A1A	25	0/10
GlycoMab anti-Her3	27	0/10
IgG-IL2 qm CH1A1A + GlycoMab anti-Her3	34	0/10

Ejemplo 6**Modelo de xenoinjerto de carcinoma renal ACHN**

El inmunoconjugado IgG-IL2 28H1 dirigido a FAP que comprende la IL-2 mutante cuádruple (qm) (SEQ ID NO: 125, 126 y 129) y el GlycoMab anti-EGFR (SEQ ID NO: 102 y 103) se sometieron a prueba en la línea de células renales humana ACHN, inyectada por vía intrarrenal en ratones SCID transgénicos para FcγRIII humano.

Las células ACHN (células de adenocarcinoma renal humano) se obtuvieron originalmente de la ATCC (American Type Culture Collection) y después de la expansión se depositaron en el banco de células interno de Roche-Glycart. Las ACHN se cultivaron en DMEM que contenía FCS al 10 %. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO₂ al 5 %. Se usó el paso 22 *in vitro* para inyección intrarrenal, con una viabilidad de un 96,4 %. Se realizó una pequeña incisión (2 cm) en el flanco derecho y la pared peritoneal de ratones SCID transgénicos para FcγRIII humano anestesiados. Se inyectaron cincuenta µl (1 x 10⁶ células de ACHN en medio AIM V) de suspensión celular 2 mm de forma subcapsular en el riñón. Las heridas superficiales y la pared peritoneal se cerraron usando suturas resolubles.

Ratones SCID hembra transgénicos para FcγRIII humano; de 8-9 semanas de edad al inicio del experimento (Roche-Glycart, Suiza) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las directrices acordadas (GV-Solas, Felasa, TierschG). Se revisó y aprobó el protocolo del estudio experimental por las autoridades gubernamentales locales (P 2011/128). Después de su llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento de salud continuo de forma periódica.

A los ratones se les inyectaron por vía intrarrenal el día 0 del estudio 1 x 10⁶ células ACHN, se aleatorizaron y se pesaron. Una semana después de la inyección de células tumorales, a los ratones se les inyectó i.v. vehículo, GlycoMab anti-EGFR, la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 28H1 y el GlycoMab anti-EGFR o la combinación de Proleukin® y el GlycoMab anti-EGFR. El GlycoMab EGFR y el inmunoconjugado IgG-IL2 28H1 se dosificaron una vez a la semana durante 3 semanas. Proleukin® se inyectó diariamente de lunes a viernes durante 3 semanas.

A todos los ratones se les inyectaron i.v. 200 µl de la solución apropiada. Las dosis se especifican en la tabla 6. A los ratones en el grupo de vehículo se les inyectó PBS y en los grupos de tratamiento GlycoMab anti-EGFR, la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 28H1 y el GlycoMab anti-EGFR o la combinación de Proleukin® y el GlycoMab anti-EGFR. Para obtener la cantidad apropiada de inmunoconjugado por 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con PBS cuando fue necesario.

La figura 6 y la tabla 6A muestran que la combinación del inmunoconjugado IgG-IL2 28H1 y el GlycoMab anti-EGFR medió una eficacia superior en términos de la mediana de supervivencia y supervivencia global potenciadas en comparación con GlycoMab anti-EGFR solo y la combinación de Proleukin® y el GlycoMab anti-EGFR.

TABLA 6.

Compuesto	Dosis	Tampón de formulación	Concentración (mg/ml)
GlycoMab anti-EGFR	625 µg	His/HisCl 20 mM Trehalosa 240 mM Tween 20 al 0,02 %, pH 6,0	26,65 (= solución madre)
IgG-IL2 28H1	78 µg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	3,46 (= solución madre)
Proleukin®	22,2 µg		1 (= solución madre)

TABLA 6A. Resumen de los datos de supervivencia correspondientes a la figura 6.

Tratamiento	Mediana de la supervivencia (días)	Supervivencia global
Vehículo	59	0/7
GlycoMab anti-EGFR	155	0/7
GlycoMab anti-EGFR + Proleukin®	174	0/7
IgG-IL2 qm 28H1 + GlycoMab anti-EGFR	no alcanzado	7/7

Ejemplo 7

Refuerzo *in vitro* de la capacidad de destrucción de linfocitos NK y expresión de linfocitos NK CD25 y CD69

por inmunoconjugados de IL-2

Como en el ejemplo 2, se evaluó la destrucción de células tumorales (LS174T) por linfocitos NK tras el tratamiento con un inmunoconjugado, en particular un inmunoconjugado que comprende IL-2 como resto efector, y un GlycoMab, en este caso un GlycoMab anti-Her3. Se detectó la destrucción de células diana midiendo la liberación de LDH en el sobrenadante celular.

Los PBMC se aislaron a partir de sangre fresca. En resumen, se diluyó la sangre 3:1 con PBS. Se apilaron aproximadamente 30 ml de la mezcla de sangre/PBS en 15 ml de Histopaque (Sigma) y se centrifugó durante 30 min a 450 g durante 30 min sin frenado. Se recogieron los linfocitos con una pipeta de 5 ml en tubos de 50 ml que contenían PBS. Se llenaron los tubos hasta 50 ml con PBS y se centrifugaron durante 10 min a 350 g. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 50 ml de PBS y se centrifugó durante 10 min a 300 g. La etapa de lavado se repitió una vez. Se contaron las células y se resuspendieron en RPMI precalentado que contenía glutamina al 1 % y FCS al 10 % con 1×10^6 células por ml. Se incubaron las células durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se extrajeron las células y se contaron.

LS174T (ECACC n.º 87060401) es una línea celular de adenocarcinoma de colon de raza blanca humana. Se cultivaron las células en EMEM que contenía glutamina al 1 %, aminoácidos no esenciales al 1 % y FCS al 10 % y se dividieron de cada dos a tres días antes de alcanzar la confluencia. Se separaron las células LS174T usando tripsina. Se contaron las células y se verificó la viabilidad. La viabilidad de las células antes del ensayo fue del 99,4 %. Se resuspendieron las células en su medio respectivo a $0,3 \times 10^6$ por ml. Se sembraron 100 µl de la suspensión celular en una placa de fondo plano tratada con cultivo celular de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se eliminó el sobrenadante de las células. A continuación, se añadieron 50 µl del GlycoMab anti-Her3 diluido (SEQ ID NO: 142 y 146) a 1000 ng/ml, 100 ng/ml y 10 ng/ml o medio a los pocillos respectivos. A continuación, se añadieron 50 µl del inmunoconjugado IgG-IL2 qm CH1A1A dirigido a CEA (SEQ ID NO: 136-138) a las concentraciones indicadas (véase la figura 7) o medio por pocillo. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 100 µl de PBMC a 3×10^6 células por ml o medio para alcanzar un volumen final de 200 µl por pocillo. Se incubaron las células durante 24 horas en la incubadora. Después de la incubación, se centrifugó la placa durante 4 minutos a 400 g y se recogió el sobrenadante. Se usaron 50 µl por pocillo del sobrenadante para medir la liberación de LDH (kit de detección de citotoxicidad con LDH de Roche). El sobrenadante restante se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior. Se resuspendieron las células en tampón FACS y se almacenaron a 4 °C antes de comenzar con la tinción FACS (véase a continuación).

La figura 7 muestra la destrucción global de células LS174T por los PBMC tras el tratamiento con GlycoMab anti-Her3 solo (panel izquierdo), el inmunoconjugado IgG-IL-2 qm CH1A1A solo (panel derecho) o la combinación del inmunoconjugado IgG-IL-2 qm CH1A1A con el GlycoMab anti-Her3 (panel derecho).

Los PBMC se recogieron después de 24 horas y se usaron para el análisis FACS de la expresión de CD25 y CD69 de linfocitos NK. Se centrifugaron las células durante 4 min a 400 g y se lavaron una vez con PBS que contenía BSA al 0,1 % (tampón FACS). A continuación se añadieron a las células 20 µl por pocillo de la mezcla de anticuerpos. Se incubaron las células durante 30 min en el frigorífico. Posteriormente, se lavaron dos veces las células con tampón FACS y se resuspendieron en 200 µl de tampón FACS que contenía PFA al 2 % por pocillo. Se realizó el análisis usando BD FACS Fortessa y la siguiente mezcla de anticuerpos: CD3 PE/Cy7 (BioLegend, n.º 300420; diluido 1:40), CD56 APC (BioLegend n.º 318310; diluido 1:20), CD69 Brilliant Violet 421 (BioLegend n.º 310929; diluido 1:40), CD25 PE (BD Bioscience n.º 557138; diluido 1:20).

La figura 8 muestra la expresión de CD25 (A) o CD69 (B) en linfocitos NK tras el tratamiento con GlycoMab anti-Her3 solo (panel izquierdo), el inmunoconjugado IgG-IL-2 qm CH1A1A solo (panel derecho) o la combinación del inmunoconjugado IgG-IL-2 qm CH1A1A con el GlycoMab anti-Her3 (panel derecho).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Roche Glycart AG
 5 <120> Inmunoterapia mejorada
 <130> 31103
 <150> EP 12179473.9
 10 <151> 08/07/2012
 <160> 146
 <170> PatentIn versión 3.5
 15 <210> 1
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 1
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 25 <210> 2
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 2

ES 2 848 732 T3

Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 2B10; VL
<400> 3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

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

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

ES 2 848 732 T3

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85 90 95

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

<210> 4
<211> 107
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> 2B10(GS); VL
<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85 90 95

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

15 <210> 5
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> 2B10; VH
<400> 5

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

ES 2 848 732 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 2F11; VL

<400> 6

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 7

ES 2 848 732 T3

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> 2F11(VI); VL

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

10 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 8
 <211> 117
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 2F11; VH

20 <400> 8

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2F11(MT); VH

10

<400> 9

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

15

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

ES 2 848 732 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2; VL

5

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> 3F2(YS); VL

<400> 11

20

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 12
<211> 117
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> 3F2; VH

<400> 12

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 13
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> 3D9, VL

<400> 13

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Leu Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 14

5 <211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> 3D9, VH

<400> 14

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

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

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

Ser Ala Ile Gly Val Ser Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 3D9(TA); VH

<400> 15

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

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

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

Ser Ala Ile Gly Val Ser Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4G8; VL

<400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

ES 2 848 732 T3

1				5				10				15				
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Arg	Ser	
			20					25						30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	
			35				40							45		
Ile	Ile	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
			50				55							60		
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	
65						70					75			80		
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Gln	Val	Ile	Pro	
			85						90						95	
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
			100						105							

<210> 17
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4G8; VH

<400> 17

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1			5					10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Lys	Gly	Trp	Leu	Gly	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105					110		

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4B3; VL

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Tyr Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 19
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4B3; VH

<400> 19

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

ES 2 848 732 T3

35

40

45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4D6; VL

<400> 20

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

Ile Gln Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 117
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 4D6; VH

5

<400> 21

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 22

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> 2C6; VL

<400> 22

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

20

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50

55

60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Gln Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2C6; VH

10 <400> 23

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Ala Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 24

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> 5H5; VL

<400> 24

ES 2 848 732 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Gln Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 25
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 5H5; VH

<400> 25

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

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

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

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

ES 2 848 732 T3

85

90

95

Lys Gly Trp Phe Thr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 26

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2C4; VL

10

<400> 26

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Gln Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

15

<210> 27

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> 2C4; VH

<400> 27

25

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2D9; VL

<400> 28

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Gln Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

ES 2 848 732 T3

100 105

<210> 29
 <211> 117
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 2D9; VH
 10 <400> 29

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 30
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> 4B8; VL

25 <400> 30

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 31
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4B8; VH

<400> 31

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 108

ES 2 848 732 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 7A1; VL

<400> 32

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Gln Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 33
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 7A1; VH

<400> 33

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

ES 2 848 732 T3

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 13C2; VL

<400> 34

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Leu Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 35
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 13C2; VH

<400> 35

ES 2 848 732 T3

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 108
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> 13E8; VL

<400> 36

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

ES 2 848 732 T3

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Asn Ile Pro
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 13E8; VH

<400> 37

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 14C10; VL

<400> 38

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Ile Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 39
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 14C10; VH

<400> 39

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Ala Trp Met Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

ES 2 848 732 T3

<210> 40
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> 17A11; VL

<400> 40

10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Asn Ile Pro
 85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 41
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> 17A11; VH

20

<400> 41

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 19G1; VL

<400> 42

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 43
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 848 732 T3

<223> 19G1; VH

<400> 43

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Ser Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

5

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44

<211> 108

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 20G8; VL

15

<400> 44

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 45
<211> 117
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> 20G8; VH

<400> 45

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 46
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> 4B9; VL

<400> 46

ES 2 848 732 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5 <210> 47
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> 4B9; VH

<400> 47

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 48
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 5B8; VL

<400> 48

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 49
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 5B8; VH

<400> 49

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

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

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

Ser Ala Ile Trp Gly Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 50
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> 5F1; VL
<400> 50

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

15 <210> 51
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 5F1; VH

5 <400> 51

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Ser Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 52

10 <211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> 14B3; VL

<400> 52

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

ES 2 848 732 T3

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 53
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 14B3; VH

<400> 53

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

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

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

Ser Ala Ile Leu Ala Ser Gly Ala Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 16F1; VL

<400> 54

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5

<210> 55

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> 16F1; VH

<400> 55

15

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

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

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

Ser Gly Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

ES 2 848 732 T3

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 56
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 16F8; VL

<400> 56

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 57
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 16F8; VH

<400> 57

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 848 732 T3

1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu
20	Ser	Cys	Ala
25	Ala	Ser	Gly
30	Phe	Thr	Phe
Ser	Ser	Tyr	
Ala	Met	Ser	Trp
35	Val	Arg	Gln
40	Ala	Pro	Gly
45	Lys	Gly	Leu
Glu	Trp	Val	
Ser	Ala	Ile	Leu
50	Gly	Ser	Gly
55	Gly	Ser	Thr
60	Tyr	Tyr	Ala
Asp	Ser	Val	
Lys	Gly	Arg	Phe
65	Thr	Ile	Ser
70	Arg	Asp	Asn
75	Ser	Lys	Asn
80	Thr	Leu	Tyr
Leu	Gln	Met	Asn
85	Ser	Leu	Arg
90	Ala	Glu	Asp
95	Thr	Ala	Val
Tyr	Tyr	Cys	
Ala	Lys	Gly	Trp
100	Phe	Gly	Gly
105	Phe	Asn	Tyr
110	Trp	Gly	Gln
Gly	Thr	Leu	
Val	Thr	Val	Ser
115	Ser		

<210> 58
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> O3C9; VL

<400> 58

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5				10						15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Thr	Ser	Ser
20								25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
35							40					45			
Ile	Asn	Val	Gly	Ser	Arg	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
50						55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Ile	Met	Leu	Pro
				85					90					95	

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 59
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> O3C9; VH

<400> 59

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 60
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> O2D7; VL

<400> 60

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser

ES 2 848 732 T3

20

25

30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 61

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> O2D7; VH

<400> 61

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 62
 <211> 108
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 28H1; VL
 10 <400> 62

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

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
 20 25 30

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

 Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
 85 90 95

 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 15 <210> 63
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> 28H1; VH

 <400> 63

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

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

 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 25 Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

ES 2 848 732 T3

50

55

60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 64
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 22A3; VL

<400> 64

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 65
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 22A3; VH

<400> 65

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ser Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 66

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 29B11; VL

<400> 66

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

ES 2 848 732 T3

65

70

75

80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 67

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 29B11; VH

10

<400> 67

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 68

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> 23C10; VL

<400> 68

ES 2 848 732 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
20 25 30

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

Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 69

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 23C10; VH

<400> 69

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Thr Asn Gly Asn Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

ES 2 848 732 T3

	100	105	110
	Val Thr Val Ser Ser		
	115		
	<210> 70		
	<211> 107		
5	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> 2B10_C3B6; VL		
10	<400> 70		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1 5 10 15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp		
	20 25 30		
	Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile		
	35 40 45		
	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50 55 60		
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65 70 75 80		
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala		
	85 90 95		
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100 105		
15	<210> 71		
	<211> 121		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	<223> 2B10_C3B6; VH		
	<400> 71		
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
	1 5 10 15		
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr		
	20 25 30		
25	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	35 40 45		

ES 2 848 732 T3

Gly Ala Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 72

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2B10_6A12; VL

<400> 72

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85 90 95

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

<210> 73

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 848 732 T3

<223> 2B10_6A12; VH

<400> 73

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2B10_C3A6; VL

<400> 74

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Val
20 25 30

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

ES 2 848 732 T3

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

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85 90 95

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

<210> 75
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 2B10_C3A6; VH

<400> 75

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 76
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 2B10_D1A2_wt; VL

<400> 76

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Val
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Tyr Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85 90 95

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

5

<210> 77

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> 2B10_D1A2_wt; VH

<400> 77

15

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

ES 2 848 732 T3

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 78

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2B10_D1A2_VD; VL

<400> 78

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Tyr Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85 90 95

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

<210> 79

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2B10_D1A2_VD; VH

<400> 79

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

ES 2 848 732 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 80

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2B10_O7D8; VL

<400> 80

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Asn Val
20 25 30

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

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

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85 90 95

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

<210> 81
 <211> 121
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 2B10_O7D8; VH
 10 <400> 81

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

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

 Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 15 <210> 82
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> 2B10_01F7; VL

 <400> 82

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

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Val
 20 25 30
 25

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85 90 95

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

<210> 83

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2B10_01F7; VH

<400> 83

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 84

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 848 732 T3

<220>

<223> 2B10_6H10; VL

5 <400> 84

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Val
20 25 30

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

Gln Ala Ala Thr Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85 90 95

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

<210> 85

10 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> 2B10_6H10; VH

<400> 85

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

ES 2 848 732 T3

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH de LC007

10

<400> 86

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

15

<210> 87

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> VL de LC007

<400> 87

25

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 88

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> HCDR1 anti-CD20

<400> 88

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr
1 5

15 <210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> HCDR2 anti-CD20

<400> 89

Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp
1 5

25 <210> 90

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR3 anti-CD20

35 <400> 90

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr
1 5 10

5 <210> 91
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> LCDR1 anti-CD20
 <400> 91

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

15 <210> 92
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> LCDR2 anti-CD20
 <400> 92

25 **Gln Met Ser Asn Leu Val Ser**
1 5

30 <210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> LCDR3 anti-CD20
 <400> 93

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
1 5

40 <210> 94
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> VH anti-CD20
 <400> 94

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

50

ES 2 848 732 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 95

5 <211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> VL anti-CD20

<400> 95

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

Arg Thr Val
115

5 <210> 96
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> HCDR1 anti-EGFR
<400> 96

Asp Tyr Lys Ile His
1 5

15 <210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> HCDR2 anti-EGFR
<400> 97

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

25 Gly

<210> 98
<211> 11
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> HCDR3 anti-EGFR
35 <400> 98

Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala
1 5 10

40 <210> 99
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> LCDR1 anti-EGFR
<400> 99

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 100
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> LCDR2 anti-EGFR
 10 <400> 100

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr
1 5

 15 <210> 101
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> LCDR3 anti-EGFR

 <400> 101

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
1 5
 25
 <210> 102
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> VH anti-EGFR

 <400> 102
 35
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

ES 2 848 732 T3

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 103

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> VL anti-EGFR

<400> 103

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

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

15 <210> 104

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> VH (1) anti-IGF-1R

<400> 104

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

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

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Leu Val Ser Val Ser Ser
115

<210> 105

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> VL (1) anti-IGF-1R

<400> 105

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys
100 105

15

<210> 106
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> VH (2) anti-IGF-1R

<400> 106

10

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

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

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 107
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> VL (2) anti-IGF-1R

20

<400> 107

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

ES 2 848 732 T3

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 108
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HCDR1 anti-CEA
<400> 108

Glu Phe Gly Met Asn
1 5

<210> 109
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HCDR2 anti-CEA
<400> 109

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 110
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HCDR3 anti-CEA

<400> 110

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 111

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> LCDR1 anti-CEA
 <400> 111

 Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala
 1 5 10
 10
 <210> 112
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> LCDR2 anti-CEA
 20 <400> 112

 Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg
 1 5
 <210> 113
 25 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> LCDR3 anti-CEA
 <400> 113

 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr
 1 5 10
 35 <210> 114
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> VH anti-CEA
 <400> 114
 45
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 115

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL anti-CEA

<400> 115

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HCDR1 anti-MCSP

5 <400> 116

Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5 10

<210> 117
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> HCDR2 anti-MCSP

<400> 117

Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

20 <210> 118
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> HCDR3 anti-MCSP

<400> 118

30 **Phe Asp Tyr**
1

<210> 119
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> LCDR1 anti-MCSP

40 <400> 119

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

45 <210> 120
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> LCDR2 anti-MCSP

<400> 120

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

55 <210> 121
<211> 9

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> LCDR3 anti-MCSP

 <400> 121

 Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr
 1 5
 10
 <210> 122
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> VH anti-MCSP

 <400> 122
 20
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

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

 Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

 <210> 123
 <211> 107
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VL anti-MCSP
 30
 <400> 123

ES 2 848 732 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 124

<211> 328

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
35 40 45

10

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
50 55 60

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
65 70 75 80

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala

[illegible]

<210> 125
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Fab HC-Fc ojal 28H1 (LALA P329G)

10

<400> 125

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

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

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

Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser		
				165					170					175			
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu		
			180					185					190				
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr		
		195					200					205					
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr		
	210					215					220						
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
225					230					235					240		
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro		
				245					250					255			
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val		
			260					265					270				
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr		
		275					280					285					
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val		
	290					295					300						
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys		
305					310					315					320		
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser		
				325					330					335			
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro		
			340					345					350				
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val		
		355					360					365					
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly		
	370					375					380						
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp		
385					390					395					400		

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 126

<211> 593

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Fab HC-Fc botón 28H1 (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 126

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

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

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

Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	145	150	155	160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	165	170	175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	180	185	190	
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	195	200	205	
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	210	215	220	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	225	230	235	240
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	245	250	255	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	260	265	270	
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	275	280	285	
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	290	295	300	
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	305	310	315	320
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	325	330	335	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	340	345	350	
Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	355	360	365	
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	370	375	380	

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser
450 455 460

Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp
465 470 475 480

Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu
485 490 495

Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu
500 505 510

Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu
515 520 525

Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp
530 535 540

Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu
545 550 555 560

Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu
565 570 575

Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu
580 585 590

Thr

<210> 127
<211> 447
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fab HC-Fc ojal 4G8 (LALA P329G)

<400> 127

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

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

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

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

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

5 <210> 128
<211> 594
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Fab HC-Fc botón 4G8 (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 128

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

ES 2 848 732 T3

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

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

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

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

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala
450 455 460

Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
465 470 475 480

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
485 490 495

ES 2 848 732 T3

Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr
500 505 510

Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
515 520 525

Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
530 535 540

Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
545 550 555 560

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
565 570 575

Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr
580 585 590

Leu Thr

<210> 129

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fab LC 4G8

<400> 129

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
20 25 30

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

Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

ES 2 848 732 T3

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 130

5 <211> 447

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Fab HC-Fc ojal 4B9 (LALA P329G)

<400> 130

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

ES 2 848 732 T3

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Lys	Gly	Trp	Phe	Gly	Gly	Phe	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	100	105	110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	115	120	125	
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	130	135	140	
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	145	150	155	160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	165	170	175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	180	185	190	
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	195	200	205	
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	210	215	220	
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	225	230	235	240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	245	250	255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	260	265	270	
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	275	280	285	
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	290	295	300	

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 131

<211> 594

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Fab HC-Fc botón 4B9 (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 131

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

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

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

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

ES 2 848 732 T3

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala
450 455 460

Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
465 470 475 480

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
485 490 495

Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr
500 505 510

Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
515 520 525

Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
530 535 540

Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
545 550 555 560

ES 2 848 732 T3

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
565 570 575

Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr
580 585 590

Leu Thr

<210> 132

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fab LC 3F2

<400> 132

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 133
<211> 445
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Fab HC-Fc ojal DP47GS (LALA P329G)

<400> 133

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

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

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

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 134
<211> 592
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fab HC-Fc botón DP47GS (LALA P329G)-IL-2 qm
<400> 134

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

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

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys
 340 345 350

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
435 440 445

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser
450 455 460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
485 490 495

Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
500 505 510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
515 520 525

Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530 535 540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
545 550 555 560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
580 585 590

<210> 135

5 <211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Fab LC DP47GS

<400> 135

ES 2 848 732 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

5 <210> 136
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>

ES 2 848 732 T3

<223> Fab HC-Fc ojal CH1A1A (LALA P329G)

<400> 136

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 137
 <211> 598
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fab HC-Fc botón CH1A1A (LALA P329G)-IL-2 qm

10 <400> 137

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460

Ser Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
465 470 475 480

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
485 490 495

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro
500 505 510

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
515 520 525

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
530 535 540

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
545 550 555 560

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
565 570 575

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
580 585 590

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
595

5 <210> 138
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Fab LC CH1A1A

<400> 138

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr
          20           25           30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
          85           90           95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
          100          105          110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
          115          120          125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
          130          135          140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145          150          155          160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
          165          170          175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215

```

<210> 139
 5 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> HCDR1 anti-Her3

<400> 139

Gly Tyr Thr Phe Arg Ser Ser Tyr Ile Ser
1 5 10

5 <210> 140
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> HCDR2 anti-Her3

<400> 140

Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Ser Pro Ser Tyr Asn Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

15
20 <210> 141
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HCDR3 anti-Her3

25 <400> 141

His Arg Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Leu Thr Tyr
1 5 10

30 <210> 142
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> VH anti-Her3

<400> 142

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Ser Ser
20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Ser Pro Ser Tyr Asn Gln Lys Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg His Arg Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Leu Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 143
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> LCDR1 anti-Her3

<400> 143

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

15 <210> 144
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> LCDR2 anti-Her3

<400> 144

25 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

30 <210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> LCDR3 anti-Her3

<400> 145

Gln Ser Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

40 <210> 146
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> VL anti-Her3

<400> 146

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Asn	Ser
			20					25					30		
Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
		35					40					45			
Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
	50					55					60				
Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65					70					75				80	
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser
				85					90					95	
Asp	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
			100					105					110		

Lys

REIVINDICACIONES

1. Una combinación, para su uso en el tratamiento del cáncer en un individuo que lo necesite, de

(a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, en la que el primer anticuerpo se dirige a un antígeno presentado en una célula tumoral o en un entorno de células tumorales, y en la que el resto efector es un resto efector IL-2 mutante que comprende al menos una mutación aminoacídica que reduce o suprime la afinidad del resto efector IL-2 mutante por la subunidad α del receptor de IL-2, pero conserva la afinidad del resto efector IL-2 mutante por el receptor de IL-2 de afinidad intermedia, en comparación con el resto efector IL-2 no mutado; y

(b) un segundo anticuerpo seleccionado del grupo de

(i) un anticuerpo de clase IgG dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 102 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 103, en el que el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado, y

(ii) un anticuerpo de clase IgG dirigido a HER3, que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 142 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 146, en la que el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado.

2. La combinación de acuerdo con el uso de la reivindicación 1, en la que el resto efector IL-2 mutante comprende tres sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a los residuos 42, 45 y 72 de IL-2 humana (SEQ ID NO: 1).

3. La combinación de acuerdo con el uso de la reivindicación 1 o 2, en la que el resto efector IL-2 mutante es IL-2 humana que comprende las sustituciones aminoacídicas F42A, Y45A y L72G.

4. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el resto efector IL-2 mutante comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2.

5. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el primer anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, en particular un anticuerpo de clase IgG, más en particular un anticuerpo de subclase IgG₁.

6. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el resto efector comparte un enlace peptídico amino o carboxiterminal con el primer anticuerpo.

7. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el primer anticuerpo se genomanipula para que tenga una unión reducida a un receptor de Fc activador, en particular una unión reducida a Fc γ R3IIa humano.

8. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el primer anticuerpo comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329 de las cadenas pesadas de inmunoglobulina (numeración EU como se describe en Kabat).

9. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el primer anticuerpo comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración EU como se describe en Kabat) en las cadenas pesadas de inmunoglobulina.

10. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el inmunoconjugado consiste esencialmente en un resto efector y un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida, en la que el resto efector se fusiona en su aminoácido aminoterminal al extremo carboxílico de una de las cadenas pesadas del primer anticuerpo, opcionalmente a través de un conector peptídico.

11. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el primer anticuerpo se dirige a un antígeno seleccionado del grupo de proteína de activación de fibroblastos (FAP), el dominio A1 de tenascina C (TNC A1), el dominio A2 de tenascina C (TNC A2), el dominio adicional B de fibronectina (EDB), antígeno carcinoembrionario (CEA) y proteoglicano de sulfato de condroitina asociado al melanoma (MCSP).

12. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el primer anticuerpo se dirige a FAP y comprende

(i) la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 12 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 11;

(ii) la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 16;

(iii) la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 47 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 46;

(iv) la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 63 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 62; o

(v) la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 67 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 66.

13. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el primer anticuerpo se dirige a CEA y comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 114 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 115.

14. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el segundo anticuerpo es un anticuerpo de clase IgG de longitud completa, en particular un anticuerpo de la subclase IgG₁.

15. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la función efectora se selecciona del grupo de unión a un receptor de Fc activador, ADCC, ADCP, CDC y secreción de citocinas.

16. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el segundo anticuerpo se genomanipula mediante la introducción de una o más mutaciones aminoacídicas en la región Fc o mediante modificación de la glucosilación en la región Fc.

17. La combinación de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que el individuo es un mamífero, en particular un ser humano.

18. Una composición farmacéutica en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que la composición farmacéutica comprende

(a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, en la que el primer anticuerpo se dirige a un antígeno presentado en una célula tumoral o en un entorno de células tumorales, y en la que el resto efector es un resto efector IL-2 mutante que comprende al menos una mutación aminoacídica que reduce o suprime la afinidad del resto efector IL-2 mutante por la subunidad α del receptor de IL-2, pero conserva la afinidad del resto efector IL-2 mutante por el receptor de IL-2 de afinidad intermedia, en comparación con el resto efector IL-2 no mutado; y

(b) un segundo anticuerpo seleccionado del grupo de

(i) un anticuerpo de clase IgG dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 102 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 103, en el que el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado, y

(ii) un anticuerpo de clase IgG dirigido a HER3, que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 142 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 146, en la que el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado.

19. Un kit para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende en el mismo recipiente o en recipientes separados

(a) un inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo genomanipulado para que tenga una función efectora reducida y un resto efector, en el que el primer anticuerpo se dirige a un antígeno presentado en una célula tumoral o en un entorno de células tumorales, y en el que el resto efector es un resto efector IL-2 mutante que comprende al menos una mutación aminoacídica que reduce o suprime la afinidad del resto efector IL-2 mutante por la subunidad α del receptor de IL-2, pero conserva la afinidad del resto efector IL-2 mutante por el receptor de IL-2 de afinidad intermedia, en comparación con el resto efector IL-2 no mutado;

(b) un segundo anticuerpo seleccionado del grupo de

(i) un anticuerpo de clase IgG dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 102 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 103, en el que el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado, y

(ii) un anticuerpo de clase IgG dirigido a HER3, que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 142 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 146, en el que el anticuerpo se genomanipula para que tenga una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado; y

(c) opcionalmente, un prospecto del envase que comprende instrucciones impresas que indican el uso del tratamiento combinado como un procedimiento para tratar el cáncer.

Figura 1A

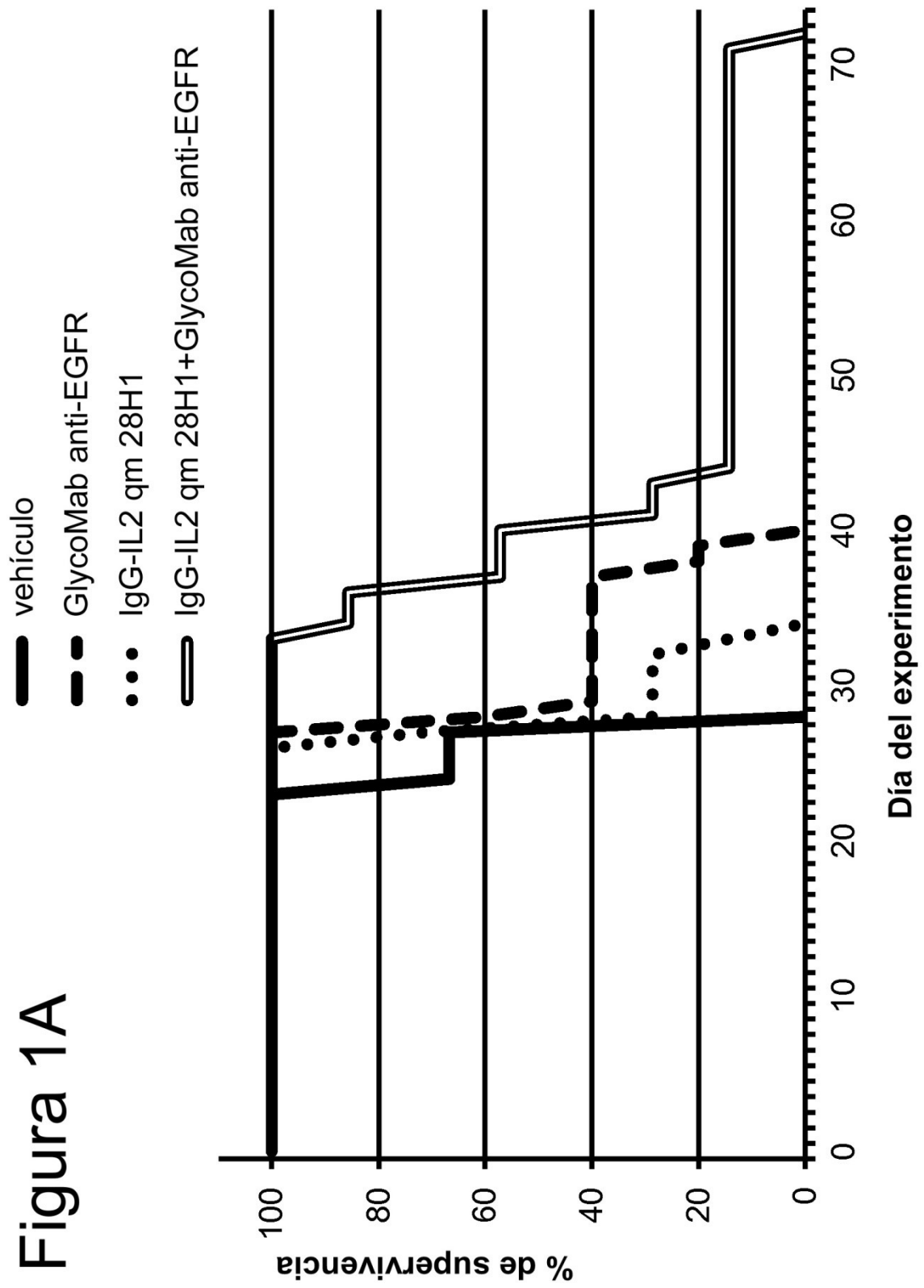


Figura 1B

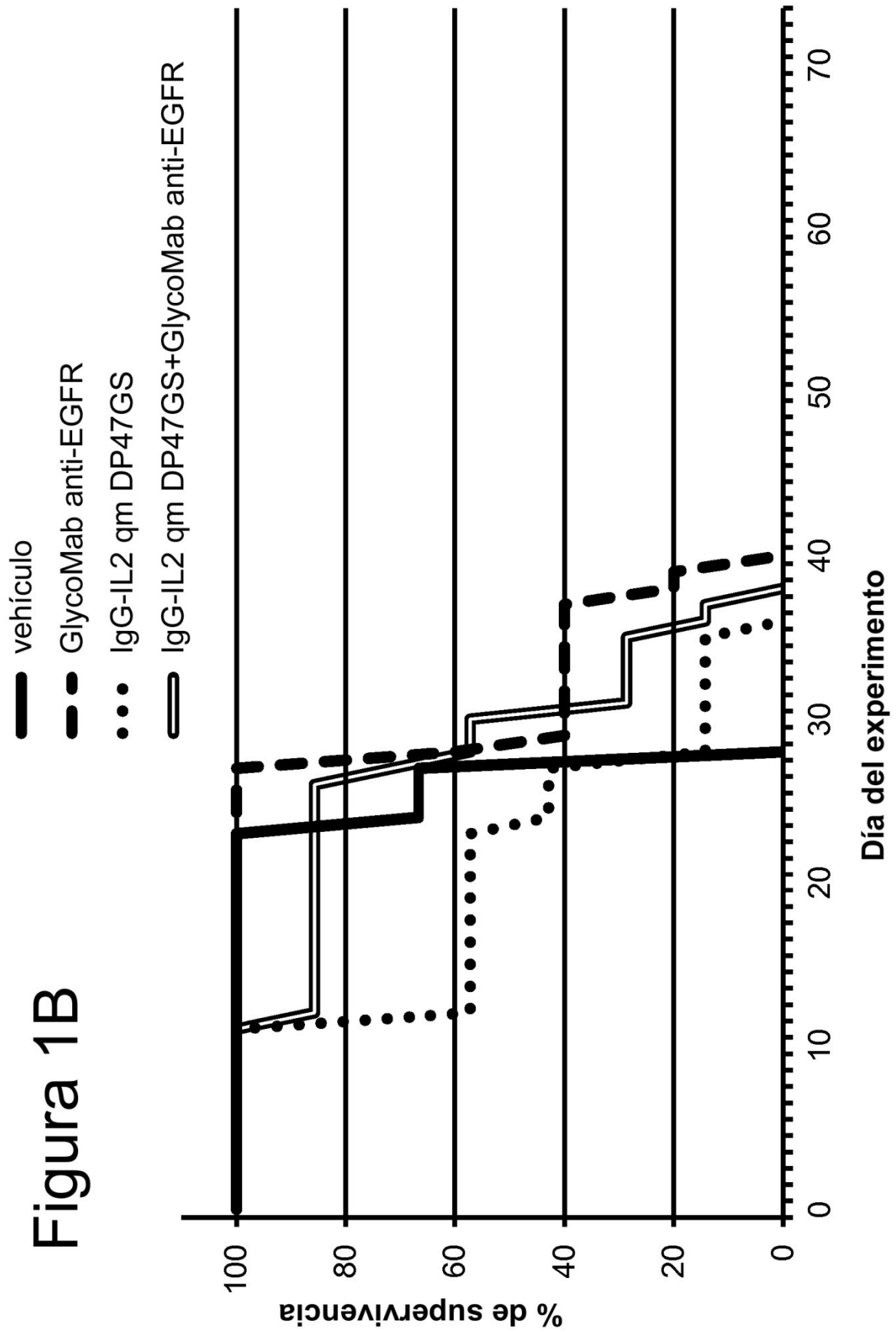


Figura 2A

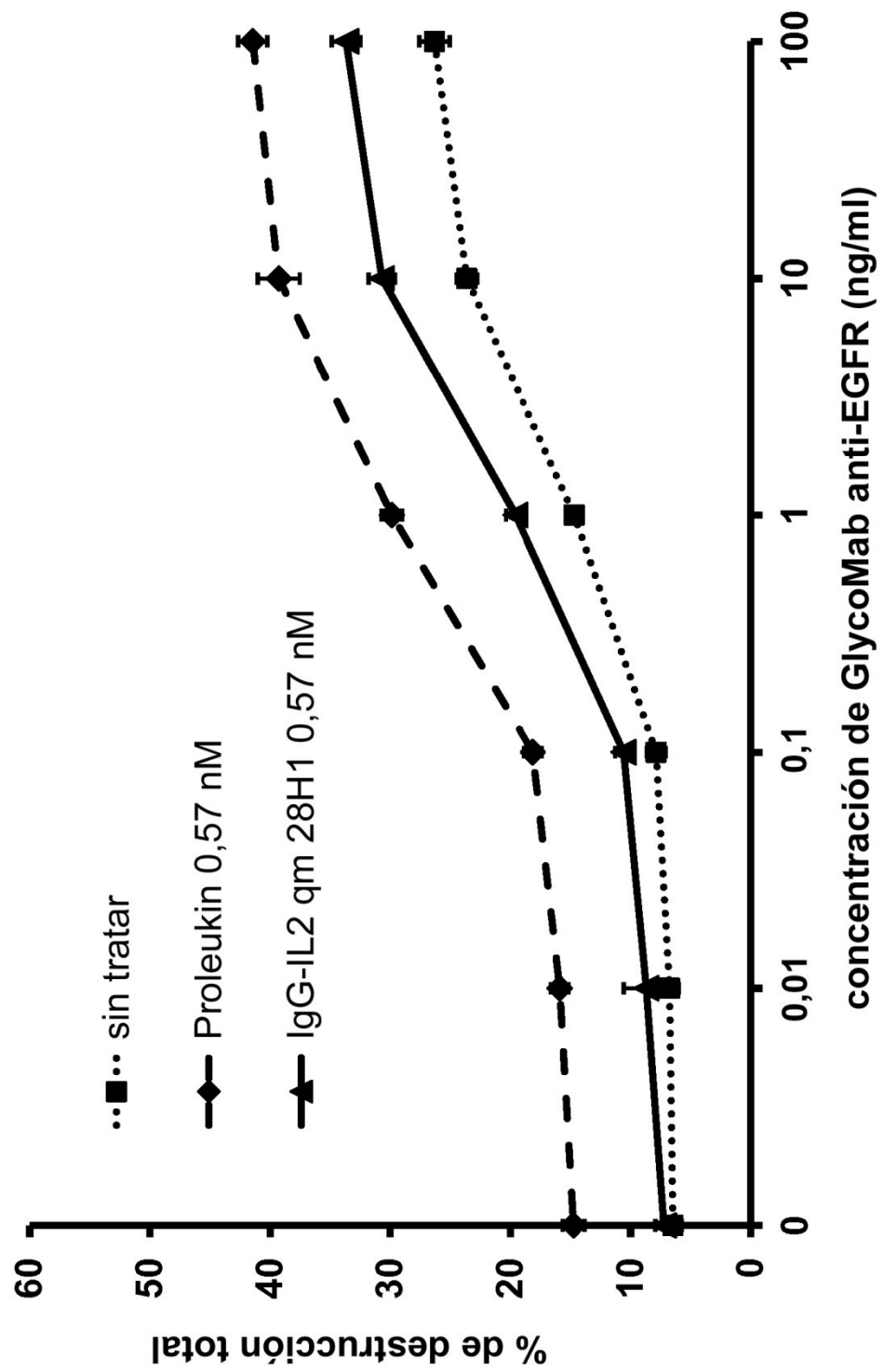


Figura 2B

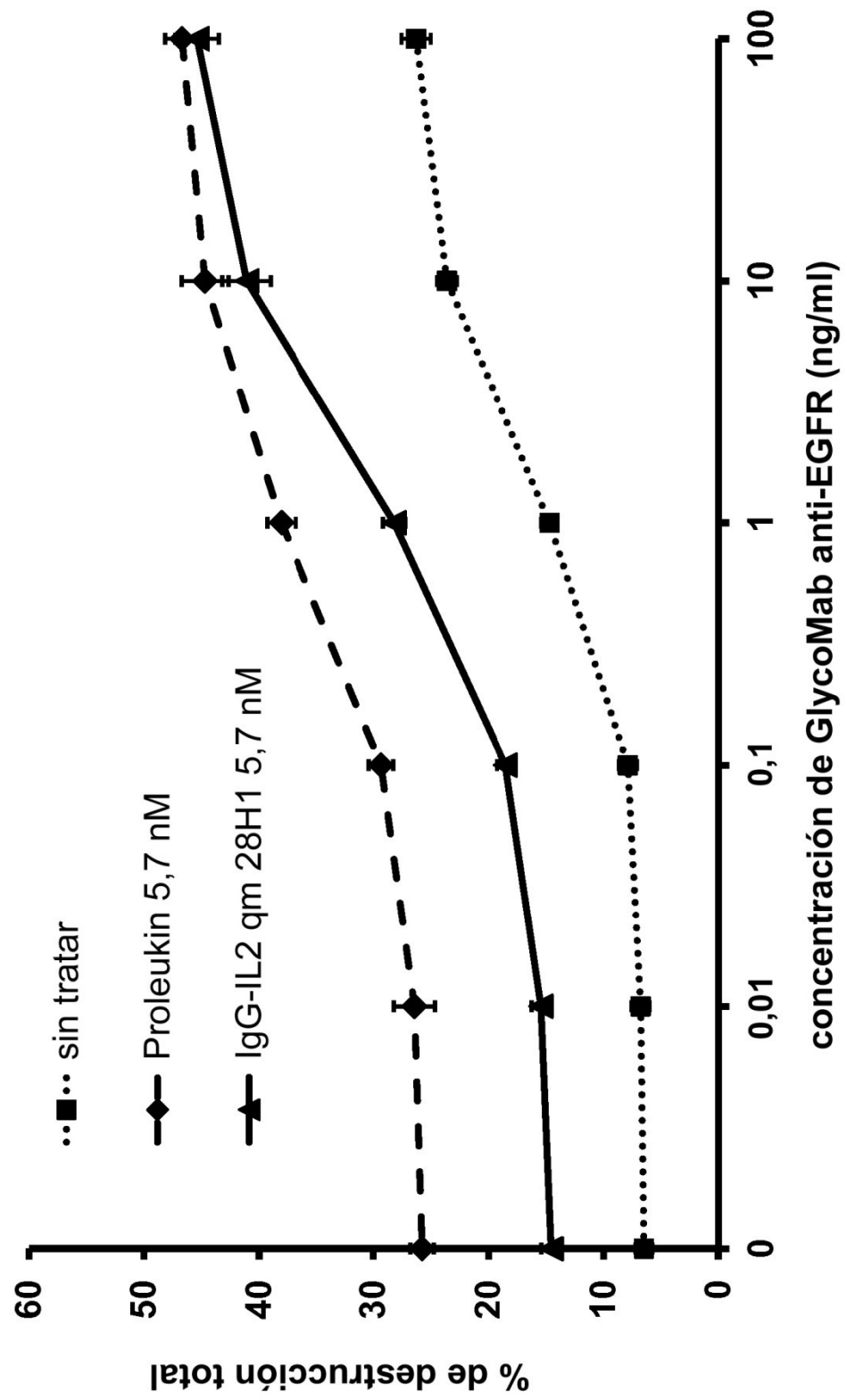


Figura 3A

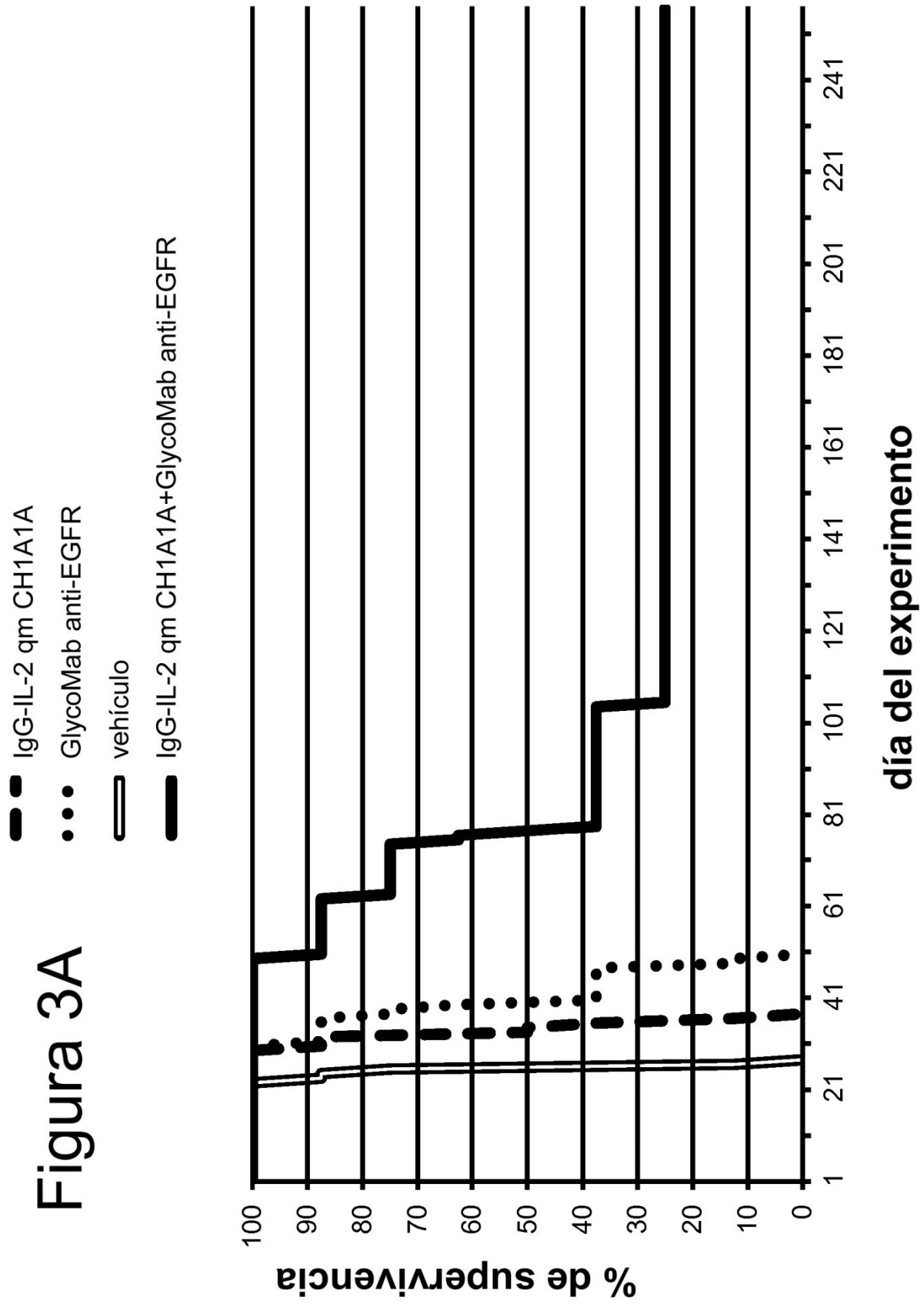


Figura 3B

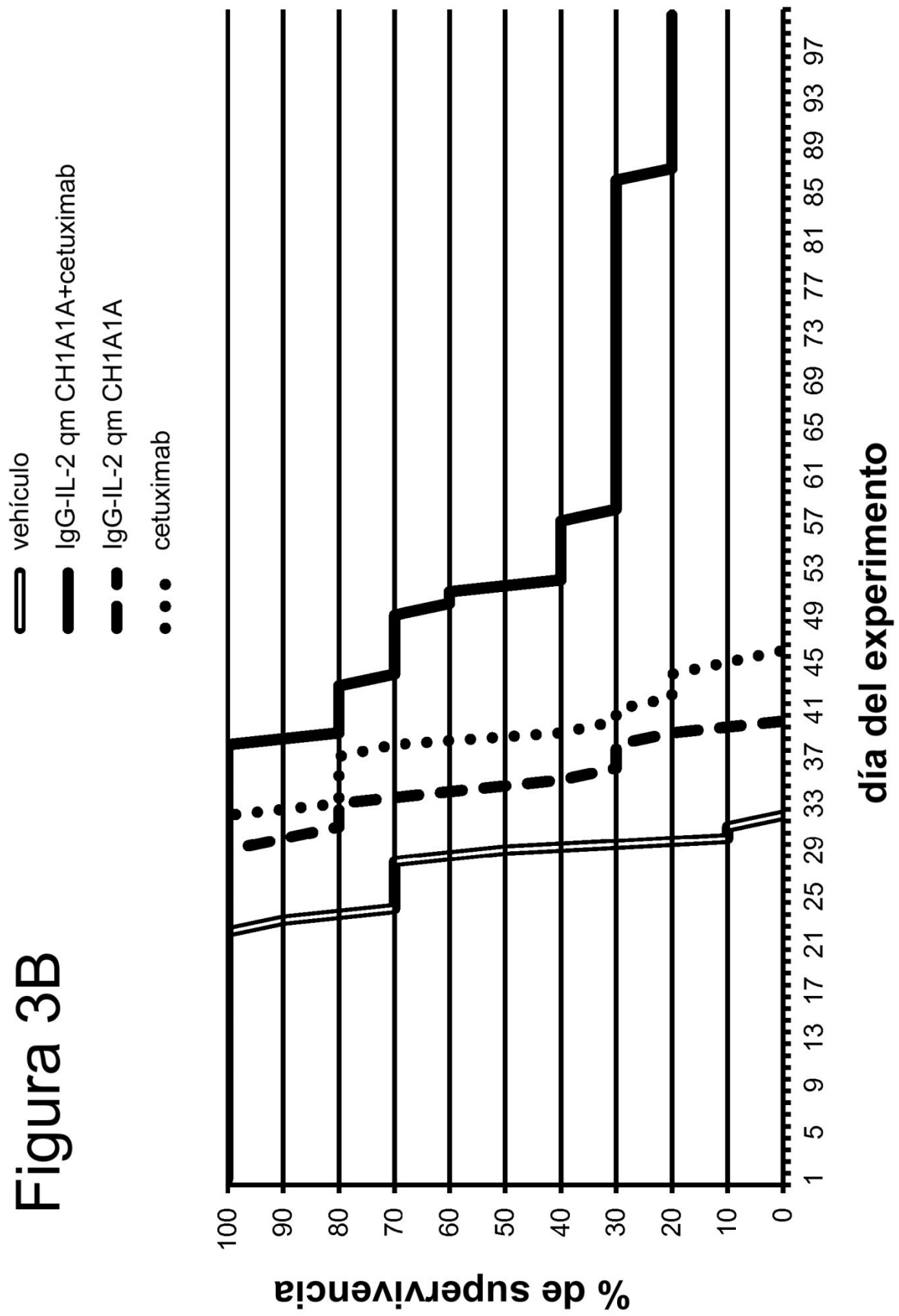


Figura 4A

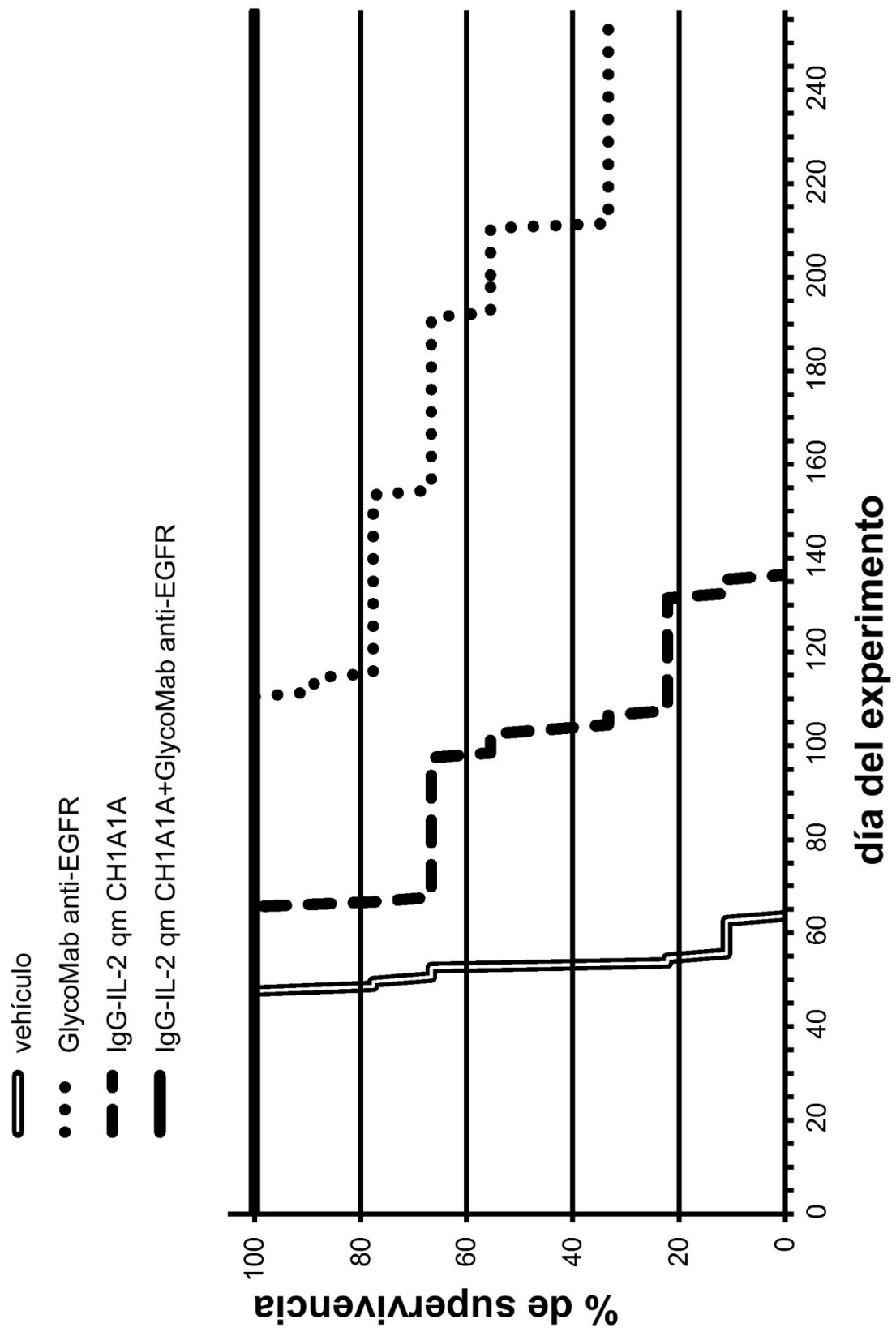


Figura 4B

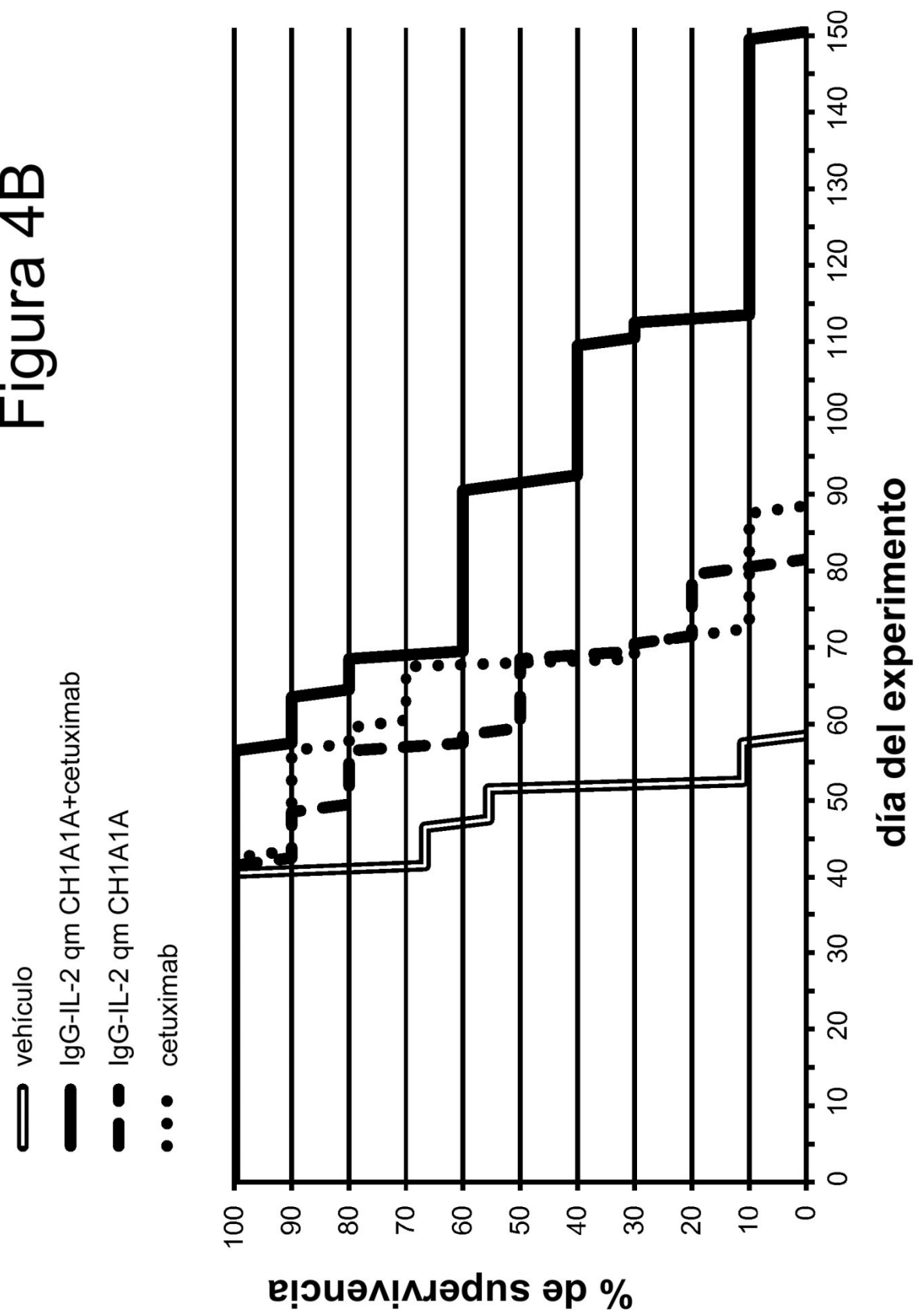


Figura 5

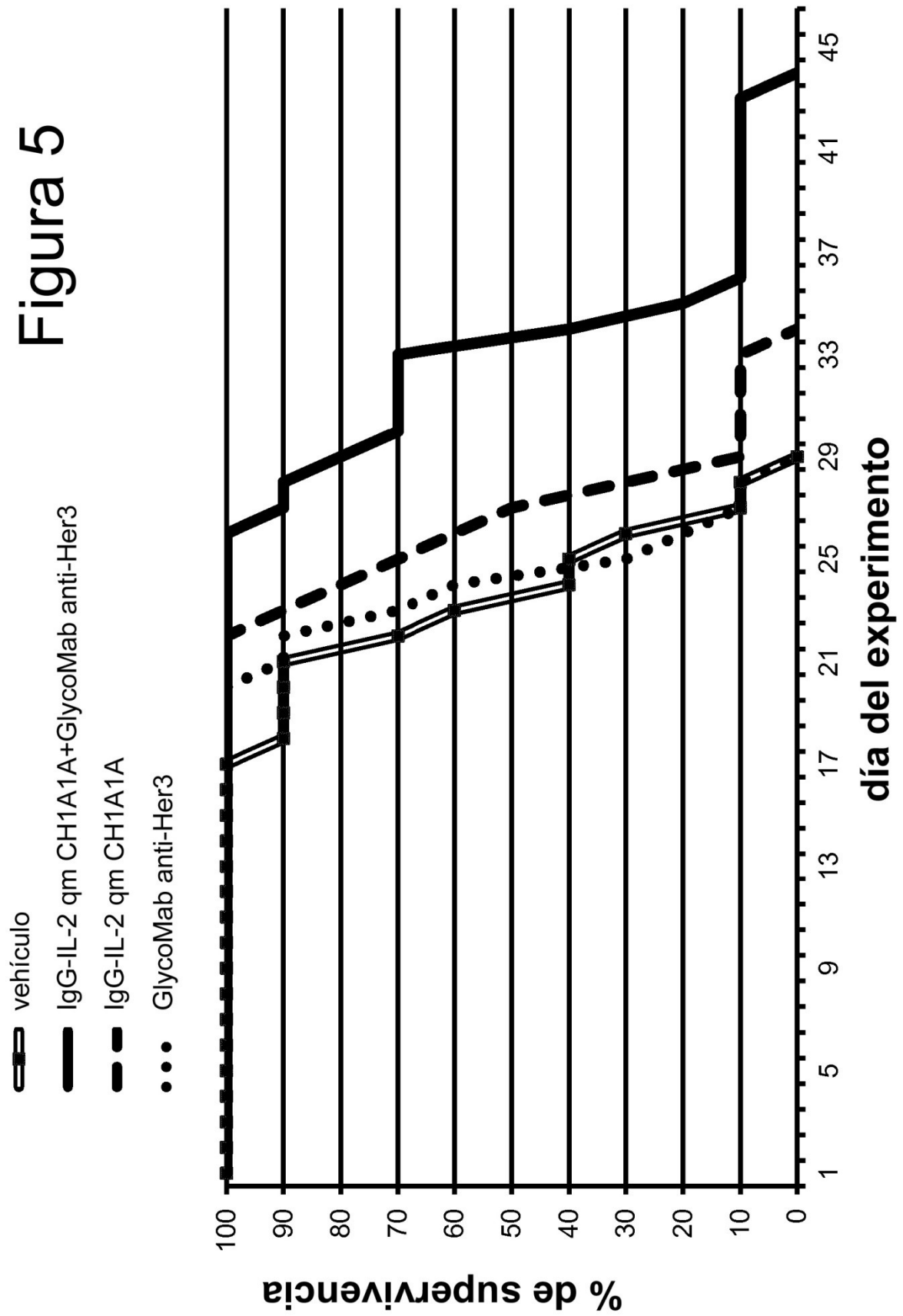
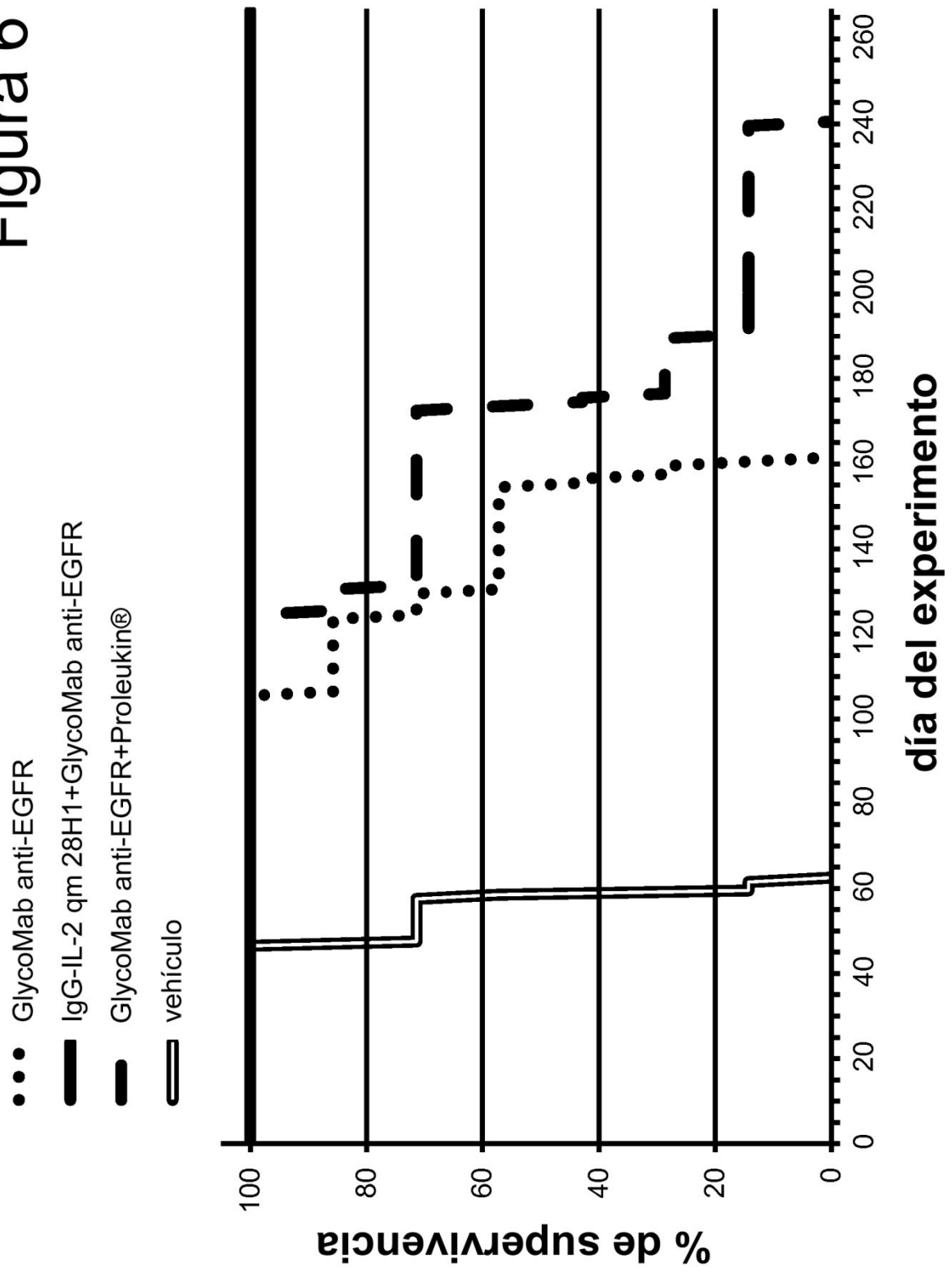


Figura 6



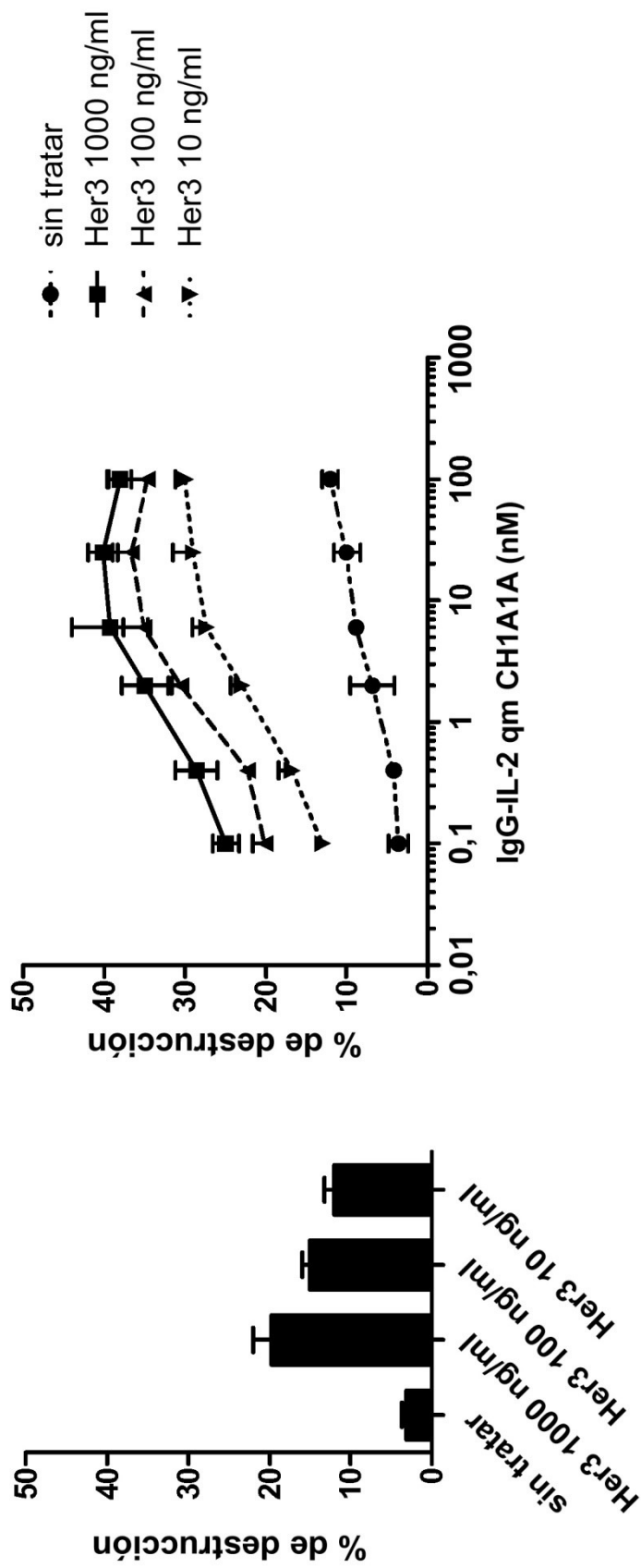


Figura 7

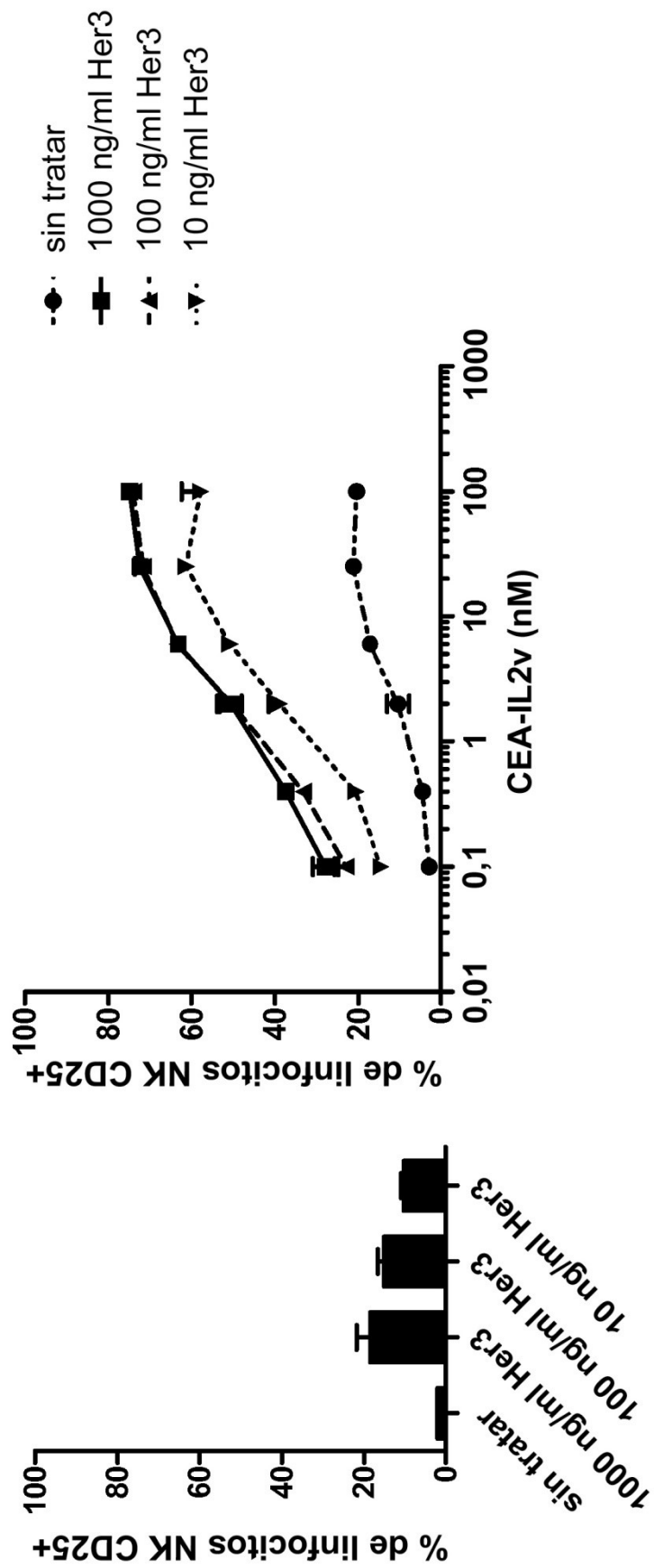


Figura 8A

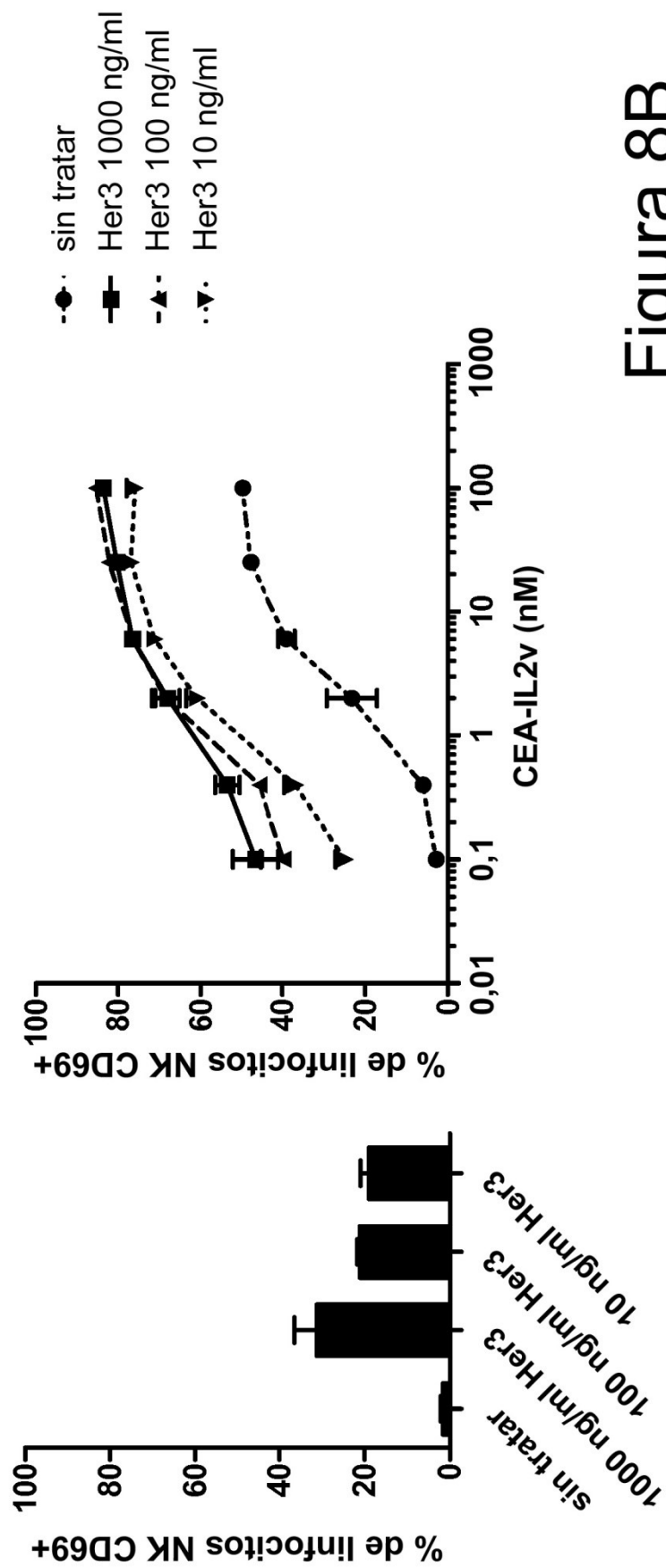


Figura 8B