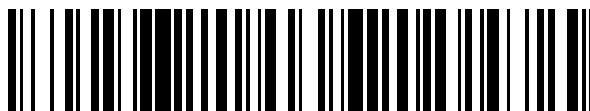


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 846 732**

51 Int. Cl.:

C07K 1/113 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2016** **PCT/EP2016/059051**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016** **WO16170138**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2016** **E 16719824 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020** **EP 3286204**

54 Título: **Método de monomerización de moléculas de anticuerpos recombinantes**

30 Prioridad:

22.04.2015 GB 201506870

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

29.07.2021

73 Titular/es:

UCB BIOPHARMA SRL (100.0%)
Allée de la Recherche 60
1070 Brussels, BE

72 Inventor/es:

HEYWOOD, SAM PHILIP;
WILD, GAVIN BARRY;
HANIF, RAZWAN y
LE PAGE, CHRISTOPHER JOHN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 846 732 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

Método de monomerización de moléculas de anticuerpos recombinantes

La presente descripción se refiere a un método para aumentar la cantidad de monómero en una composición de moléculas de anticuerpo expresadas de forma recombinante y composiciones obtenidas u obtenibles a partir del método descrito en el presente documento.

Los anticuerpos monoclonales terapéuticos se han convertido en una clase muy importante de agentes terapéuticos. Como se describe en la publicación internacional WO2010/019493 la purificación y formulación de estas moléculas de anticuerpo representa un desafío. Sin embargo, es de vital importancia que solo se emplee material de la más alta calidad en aplicaciones terapéuticas.

Es bien conocido en la técnica que las proteínas recombinantes, particularmente las expresadas en procariotas, no son biológicamente activas si no se pliegan en la estructura terciaria adecuada, sino que forman grandes agregados de proteína plegada incorrectamente, también denominados cuerpos de inclusión. El uso de caótropos para desnaturalizar y disolver eficazmente dichos agregados de proteínas es conocido en la técnica. Por ejemplo, la publicación internacional WO2007/014170 analiza muchos de los problemas asociados con la agregación de composiciones de proteínas recombinantes y describe un sistema de tamponamiento que comprende acetato de sodio y/o cloruro de sodio y un agente caotrópico. El método se describe con respecto a la desagregación de un formato de anticuerpo específico llamado un producto inmunofarmacéutico modular pequeño que comprende un dominio de unión de cadena sencilla y una región FC, usando un caótropro en solución de tampón ácida. El dominio de unión de cadena sencilla no contiene un enlace disulfuro estabilizador.

Los nuevos formatos de anticuerpos a menudo requieren la presencia de al menos una región Fv que comprende un dominio ligero variable (VL) y un dominio pesado variable (VH) en donde los dominios variables no están en su estado natural de estar unidos en el extremo C al dominio constante ligero (CL) o dominio pesado constante (CH1). En una molécula de anticuerpo completa de origen natural, la presencia de los dominios CL y CH1 actúa para estabilizar el emparejamiento de VL y VH. Por consiguiente, en ausencia de los dominios CL y CH1, los dominios variables son propensos al intercambio dinámico con dominios variables de moléculas adyacentes. Una forma de detener este proceso dinámico es por la introducción de un enlace disulfuro entre el V_H y V_L que bloquea el emparejamiento de la región v y evita el intercambio dinámico. Sin embargo, la presencia del enlace disulfuro también puede actuar para estabilizar multímeros no deseados del anticuerpo.

Los nuevos formatos de anticuerpos también comprenden a menudo conectores. Sin embargo, la presencia de los conectores puede dar como resultado la formación de multímeros no deseados cuando el dominio variable en una molécula se empareja con un dominio variable en otra molécula, uniendo así las dos moléculas entre sí. La presencia de un enlace disulfuro en el Fv actúa entonces para estabilizar la especie multimérica.

Un ejemplo de un formato de anticuerpo biespecífico conocido son los anticuerpos Fab-dsFv como se describe en detalle en las publicaciones internacionales WO2010/035012 y WO2011/036460. Este formato de anticuerpo tiene propensión a formar multímeros que comprenden dos o más monómeros, como se muestra en la Figura 9. También se presentan especies multiméricas similares en composiciones que comprenden moléculas de scFv unidas por disulfuro en donde el VH de un scFv se empareja con el VL de un scFv separado para formar parejas de Fv estabilizadas con disulfuro que unen dos moléculas de scFv entre sí dando como resultado un dímero de dos scFv. Otros emparejamientos de dominios variables en moléculas separadas pueden crear especies multiméricas más grandes.

Ye Duan et al., *Molecular Immunology* vol. 51 (2), 2012, páginas 188-196, describen la solubilización de un scFv estabilizado con disulfuro usando urea 8 M y β-mercaptoetanol al 0,8%.

Los métodos conocidos de purificación, tales como la cromatografía, son capaces de separar especies multiméricas grandes de especies monoméricas más pequeñas, pero inevitablemente dan como resultado un menor rendimiento global de anticuerpos. Por consiguiente, para los formatos de anticuerpos biespecíficos existe una gran necesidad de métodos para abordar el problema de las especies multiméricas no deseadas en las composiciones de anticuerpos.

El método de la presente descripción proporciona una solución al problema anterior al reducir la cantidad de multímero en composiciones que comprenden moléculas de anticuerpos. La presente descripción es especialmente útil para proporcionar composiciones de moléculas de anticuerpos monoclonales monoméricas adecuadas para uso humano.

Por tanto, se proporciona un método para aumentar el porcentaje de monómero en una composición de moléculas de anticuerpos expresadas de forma recombinante, caracterizado porque la molécula de anticuerpo comprende al menos un Fv con especificidad por un antígeno de interés, que comprende un VH y un VL en donde dichos VH y VL están conectados directa o indirectamente a través de uno o más conectores y están estabilizados por un enlace disulfuro entre ellos, dicho método comprende: a) una etapa de conversión de tratamiento de la composición con un desnaturizante seleccionado del grupo que consiste en urea e hidrócloruro de guanidina, en donde la urea está en una concentración de 1 a 5 molar o el hidrócloruro de guanidina está en una concentración de 1 a 2 molar; b) en donde la etapa a) se realiza en presencia de un agente reductor o después del tratamiento con un agente reductor, en donde el agente reductor es un agente reductor tiol que comprende un solo grupo tiol, y en donde el agente reductor está en

una concentración de 10 a 150 milimolar.

El empleo del procedimiento descrito en el presente documento para la molécula de anticuerpo expresada de forma recombinante aumenta ventajosamente la cantidad de monómero en la composición. Además, el método del presente documento puede emplearse de manera fácil y rentable a escala comercial.

- 5 El método de la presente invención es capaz de convertir especies multiméricas en monómeros, aumentando así el porcentaje de monómero. La etapa de conversión permite ventajosamente que el agente reductor reduzca el enlace disulfuro entre el VH y VL y que la especie multimérica se desnaturalice parcialmente y, por lo tanto, desensamble los multímeros. El método también permite que los dominios VH y VL formen pares de Fv dentro de las moléculas de anticuerpo individuales y se vuelva a formar el enlace disulfuro estabilizador entre VH y VL dando como resultado monómeros. En consecuencia, en contraste con los usos conocidos de urea y guanidina para disolver agregados de proteínas que no se han plegado correctamente, los autores de la invención han mostrado sorprendentemente que se puede usar urea o guanidina y un agente reductor para convertir los multímeros de anticuerpos que se han formado debido a la presencia de uno o más conectores y un enlace disulfuro estabilizador, en monómeros del anticuerpo sin desnaturalizar completamente el anticuerpo. El método de la presente invención también permite de manera ventajosa que se vuelvan a formar los enlaces disulfuro correctos para producir los monómeros deseados.

Se ha mostrado que el agente reductor solo no proporciona más de 25% como máximo de monómeros usando β -mea. Sin embargo, se ha mostrado que la combinación de un agente reductor y un desnaturalizante suave proporciona niveles mucho más altos de monómero, por ejemplo en la región de 80% de monómero.

- 20 En una realización, el aumento de la concentración de monómero es de 2, 3 o 4 veces. El método de la presente invención preferiblemente proporciona una composición de anticuerpos recombinantes después de la etapa de conversión que comprende al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, 75%, 80%, 85% o al menos 90% de anticuerpo en forma monomérica.

En una realización, se proporciona una composición obtenida u obtenible a partir del procedimiento.

- 25 La presente descripción también describe el uso de la composición obtenida a partir del método descrito en el presente documento para su uso en tratamiento.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el % de monómero y la cantidad de monómero obtenidos después de la adición de β -mea al anticuerpo A26 Fab-645dsFv purificado a temperatura ambiente, obtenido por análisis de SE-UPLC.

- 30 La figura 2A+2B muestra el % de monómero y la concentración de monómero obtenidos respectivamente para el anticuerpo A26 Fab-645dsFv después de realizar una conversión empleando β -mea y guanidina.

La figura 2C+D muestra el % de monómero y el rendimiento obtenidos respectivamente para el anticuerpo A26 Fab-645dsFv después de realizar una conversión empleando β -mea y urea.

La figura 2E muestra la cantidad de monómero obtenida para el anticuerpo A26 Fab-645dsFv después de realizar una conversión empleando β -mea y urea.

- 35 La figura 3 muestra una evolución temporal del % de monómero en una composición del anticuerpo A26 Fab-645dsFv durante una etapa de conversión que emplea β -mea y urea.

La figura 4 muestra una gráfica de contorno para el % de rendimiento de monómero para un intervalo de parámetros.

La figura 5 muestra una gráfica de contorno para el % de rendimiento de monómero para un intervalo de parámetros.

- 40 La figura 6 muestra en una gráfica de zona óptima el rendimiento de monómero para la concentración de urea y la concentración de β -mea.

La figura 7 muestra el cromatograma de SE-UPLC del material de alimentación antes de la etapa de conversión.

La figura 8 muestra el cromatograma de SE-UPLC de la muestra después de la etapa de conversión, en donde las condiciones de ensayo eran urea 4.7 M y β -mea 115 mM.

La figura 9 muestra un Fab-dsFv monomérico y versiones multiméricas de Fab-dsFv.

- 45 Las figuras 10 a 17 muestran varias secuencias de moléculas de anticuerpos y componentes de las mismas.

La figura 18 muestra ejemplos de formatos de anticuerpos.

La figura 19 muestra ejemplos de formatos de anticuerpos.

Descripción detallada

El término multímeros o forma multimérica como se usa en el presente documento se refiere a formas de anticuerpos que consisten en los dominios de dos o más monómeros de anticuerpos en los que todos los dominios están plegados y emparejados correctamente. A modo de ejemplo, los multímeros pueden formarse a partir de dos o más monómeros de anticuerpos en donde cada dominio VH se empareja con un dominio VL para formar una región Fv complementaria, tal como se muestra para Fab-dsFv en la Figura 9.

En una realización, aumentar el porcentaje de monómero como se emplea en el presente documento se refiere a obtener un valor numérico de molécula de anticuerpo monomérica que es un porcentaje más alto del rendimiento total de la proteína objetivo en comparación con el porcentaje de molécula de anticuerpo monomérica obtenido antes de que se aplicara el procedimiento de la presente descripción. Por ejemplo, el porcentaje de monómero puede ser al menos 30% del rendimiento inicial de moléculas de anticuerpo y después de aplicar el presente procedimiento el porcentaje de monómero puede ser al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85% o al menos 90%. En una realización, el valor numérico absoluto, es decir, el rendimiento de monómero aislado es mayor después de llevar a cabo el procedimiento de la presente descripción.

El rendimiento o proteína total como se emplea en el presente documento se refiere al valor combinado de las especies de moléculas de anticuerpos en la composición. En una realización, el valor del rendimiento empleado es el valor antes del procesamiento según la presente descripción.

En una realización, el valor del rendimiento empleado es la cantidad de proteína total (especies de moléculas de anticuerpos) recuperada después de llevar a cabo el procedimiento según la presente descripción.

La proteína total (especies de moléculas de anticuerpos) recuperada después de llevar a cabo el procedimiento de la presente descripción se reducirá porque el procesamiento inevitablemente da como resultado algunas pérdidas.

La proteína objetivo se refiere a la molécula de anticuerpo recombinante que se expresa.

La proteína recombinante es una proteína, tal como una molécula de anticuerpo expresada empleando técnicas recombinantes.

A menos que el contexto indique lo contrario, la concentración de anticuerpos como se emplea en el presente documento, también denominada concentración de alimento, se refiere al material que comprende la proteína objetivo y sus multímeros, la concentración de todas las especies de anticuerpos, incluidos monómeros y multímeros. En una realización, la concentración de anticuerpos es la concentración de anticuerpos en la composición después de una etapa de purificación con proteína A para eliminar las impurezas de la composición.

El agente reductor como se emplea en el presente documento se refiere a un agente reductor capaz de reducir un enlace disulfuro en la molécula en cuestión, tal como el anticuerpo. El agente reductor en presencia de un anticuerpo que comprende uno o más enlaces disulfuro tiene la capacidad, en condiciones apropiadas, de reducir el enlace disulfuro, por ejemplo a una forma -SH. En una realización, el propio agente reductor comprende un solo grupo tiol.

Tiol, como se emplea en el presente documento, se refiere a un grupo que comprende la entidad -SH.

En una realización, el agente reductor se selecciona del grupo que comprende: glutatión (GSH), 2-mercaptoetanol (BME), 2-mercaptoetilamina, incluidas sus sales tales como hidrocloreto (también denominada BMEA, bMEA o B-mea, β -mea o β mea), cisteína, tal como cisteína-HCl.

El uso de agentes reductores, particularmente agentes reductores tiol que comprenden un solo grupo tiol, es beneficioso ya que el enlace disulfuro deseado entre las regiones variables de los monómeros se forma naturalmente después de llevar a cabo el procedimiento, es decir, sin la necesidad de llevar a cabo una etapa de oxidación específica al final del procedimiento. Ejemplos de agentes reductores tiol que comprenden un grupo tiol incluyen, pero no se limitan a glutatión, mercaptoetanol (tal como 2-mercaptoetanol), mercaptoetilamina (tal como 2-mercaptoetilamina) y cisteína (tal como cisteína-HCl).

En una realización, el agente reductor tiol es mercaptoetanol (tal como 2-mercaptoetanol), mercaptoetilamina (tal como 2-mercaptoetilamina) y, en particular, 2-mercaptoetilamina (también denominada BMEA, bMEA o B-mea, β -mea o β mea).

Un beneficio adicional del método según la presente descripción es que la molécula de anticuerpo no se despliega por las condiciones empleadas. Es decir, se minimiza la desactivación que resulta de que se desplieguen polipéptidos/proteínas plegados apropiadamente y se evita la necesidad de volver a plegar el anticuerpo. En una realización, en donde el anticuerpo comprende múltiples enlaces disulfuro, no se reducen todos los enlaces disulfuro del anticuerpo. Por tanto, en moléculas tales como las denominadas Fab-dsFv, los enlaces disulfuro intracatenarios en el fragmento Fab y el Fv del anticuerpo no se reducen por el método de la presente invención. La β -mea es particularmente ventajosa para las moléculas Fab-dsFv.

La concentración de agente reductor está en el intervalo de 10 mM a 150 mM, por ejemplo, de 50 a 150 mM, de 80 a 150 mM, de 90 a 140, de 95 a 135 mM, tal como 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135,

140, 145 o 150 mM.

La urea está en una concentración de 1 a 5 molar o el hidrocloreuro de guanidina está en una concentración de 1 a 2 molar;

5 La urea, como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto orgánico también conocido como carbamida, con la fórmula química $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$.

La guanidina, como se emplea en el presente documento, tiene la fórmula $\text{HNC}(\text{NH}_2)_2$ o una sal de la misma. Preferiblemente se usa hidrocloreuro de guanidina.

10 En una realización, el desnaturalizante en la etapa a) es urea. En una realización, la concentración de urea en el tratamiento según la presente descripción está en el intervalo de 1 a 5 molar, por ejemplo, de 2 a 5 molar, de 2.5 a 5 molar, de 3 a 5 molar, de 4 a 5 molar, de 4.0 a 4.9 molar o de 4.5 a 4.9 molar, tal como 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 o 4.9 molar, en particular 4.7 molar. En una realización, la concentración de urea es inferior a 5 molar.

15 En una realización, la concentración de urea está en el intervalo de 3 a 5 M y el agente reductor es 2-mercaptoetilamina en una concentración en el intervalo de 10 a 150 mM. En una realización, la concentración de urea está en el intervalo de 3 a 5 M y el agente reductor es 2-mercaptoetilamina en una concentración en el intervalo de 50 a 150 mM. En una realización, la concentración de urea está en el intervalo de 3 a 5 M y el agente reductor es 2-mercaptoetilamina en una concentración en el intervalo de 80 a 150 mM. En una realización, la concentración de urea está en el intervalo de 4 a 5 M y el agente reductor es 2-mercaptoetilamina en una concentración en el intervalo de 80 a 150 mM. En una realización, la concentración de urea está en el intervalo de 4.5 a 4.9 M y el agente reductor es 2-mercaptoetilamina en una concentración en el intervalo de 95 a 135 mM. En una realización, la concentración de urea es 4.7 M y el agente reductor es 2-mercaptoetilamina en una concentración de 115 mM.

En una realización, el desnaturalizante en la etapa a) es hidrocloreuro de guanidina (también denominado guanidina). En una realización, la concentración de guanidina se selecciona de 1.0 a 2.5 M, de 1.0 a 2.0 M, de 0.5 a 1.5 M, tal como 1.0 M.

25 En una realización, la concentración de guanidina está en el intervalo de 0.5 a 1.5 M y el agente reductor es 2-mercaptoetilamina en una concentración en el intervalo de 10 a 150 mM. En una realización, la concentración de guanidina está en el intervalo de 0.5 a 1.5 M y el agente reductor es 2-mercaptoetilamina en una concentración en el intervalo de 10 a 50 mM. En una realización, la concentración de guanidina es 1.0 M y el agente reductor es 2-mercaptoetilamina en una concentración de 10 mM.

30 En una realización, se usa urea o guanidina como desnaturalizante en la etapa a).

En una realización, el agente reductor se añade a la composición de la molécula de anticuerpo recombinante, antes de añadir la urea o la guanidina.

35 En esta realización, la etapa a) se puede llevar a cabo después del tratamiento con el agente reductor. En esta realización, el agente reductor puede permanecer en la composición durante el tratamiento con el desnaturalizante o el agente reductor se separa antes de la etapa a). Cuanto más fuerte sea el agente reductor, más probable será que sea adecuado para usar en una etapa de pretratamiento y se separe antes de la etapa a). Si es necesario, el agente reductor se puede separar antes de la etapa a) por técnicas de rutina que incluyen diafiltración y similares.

40 Alternativamente, el agente reductor permanece en la composición durante el tratamiento con el desnaturalizante en la etapa a) y esto es particularmente beneficioso para agentes reductores que contienen un solo grupo tiol, tales como los agentes reductores seleccionados de glutatión, mercaptoetanol (tal como 2-mercaptoetanol), mercaptoetilamina (tal como 2-mercaptoetilamina) y cisteína (tal como cisteína-HCl).

En una realización, el agente reductor se añade a la composición de la molécula de anticuerpo recombinante, después de añadir la urea o guanidina.

45 En una realización, el agente reductor se añade a la composición de la molécula de anticuerpo recombinante, simultáneamente con la adición de urea o guanidina.

En las realizaciones anteriores, en donde el agente reductor se añade antes del tratamiento con el desnaturalizante en la etapa a) y permanece en la composición durante el tratamiento con el desnaturalizante en la etapa a) o se añade después de añadir el desnaturalizante o se añade concomitantemente con el desnaturalizante, el agente reductor se puede separar durante o después de la etapa a) por técnicas de rutina que incluyen diafiltración y similares.

50 En una realización, el método comprende una etapa adicional de separar la urea o la guanidina.

En una realización, tras la separación de la urea o guanidina, el método comprende una etapa adicional de someter la composición a condiciones oxidantes después de la etapa a) para volver a formar uno o más enlaces disulfuro en el anticuerpo. Alternativamente, el método no comprende una etapa de someter la composición a condiciones

oxidantes después de la etapa a). No se requiere una etapa de oxidación particularmente cuando se usa un agente reductor que comprende un solo grupo tiol, tal como glutatión, mercaptoetanol (tal como 2-mercaptoetanol), mercaptoetilamina (tal como 2-mercaptoetilamina) y cisteína (tal como cisteína-HCl).

5 En una realización, la temperatura a la que se lleva a cabo el método es a temperatura ambiente, por ejemplo en el intervalo de 15 a 25°C, tal como 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25°C. De forma adecuada, el método se lleva a cabo en el intervalo de 18 a 25°C, tal como de 18 a 22°C.

10 Una temperatura en el intervalo que se emplea en el presente documento no significa necesariamente que la composición se mantenga a la misma temperatura durante la duración del procedimiento, sin embargo, la composición generalmente se mantiene a una o más temperaturas en el intervalo expuesto, durante el período a lo largo del cual se lleva a cabo el método. Si, y cuando, la temperatura se desvía o se desplaza fuera del intervalo durante el tratamiento, el controlador tomará medidas para llevar la composición dentro del intervalo deseado.

15 En el método de la presente invención, la etapa de conversión se lleva a cabo adecuadamente durante un período de al menos 5 minutos, al menos 15 minutos o al menos 30 minutos. En una realización, el período a lo largo del cual la composición de moléculas de anticuerpo se trata de acuerdo con la presente descripción está en el intervalo de 1 a 70 horas, por ejemplo de 2 a 60 horas, tal como de 3 a 50 horas, de 3 a 10 horas, de 4 a 6 horas, de 5 a 6 horas, de 4.5 a 5.5 horas en particular 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 horas. En una realización, el período es aproximadamente de 4 a 6 horas, tal como de 4 a 5 horas o de 5 a 6 horas.

20 En una realización, el método de acuerdo con la presente descripción comprende agitación, por ejemplo, donde la agitación está en el intervalo de 100 a 1200 rpm, tal como 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 o 1200 rpm.

25 En una realización, una o más etapas del procedimiento se realizan a un pH en el intervalo de 3.5 a 9, por ejemplo, 3.8, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 u 8. En una realización en donde está presente un aminoácido en la composición, el pH de la composición se ajusta a pH 7 usando un agente de ajuste del pH, por ejemplo, ácido fosfórico, antes del tratamiento según la presente descripción. Esta etapa de ajuste del pH es particularmente ventajosa cuando se añade lisina, que puede tener un pH alto de aproximadamente pH 10. En esta realización, el uso de una etapa de ajuste del pH a pH 7 mejora el rendimiento de la proteína recombinante. En una realización, se llevan a cabo una o más etapas del procedimiento a un pH en el intervalo de 3.5 a 9, por ejemplo 3.8, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 u 8.

En una realización, la concentración de moléculas de anticuerpo en la composición está en el intervalo de 1 a 5 g/l, por ejemplo, de 2 a 4 o 2 a 3 g/l, en particular 2.75 g/l.

30 En una realización, la composición de moléculas de anticuerpo no comprende una sal en una concentración de entre 0.1 M y 8 M.

En una realización, las condiciones robustas para llevar a cabo el método de la presente invención incluyen urea de 4.5 a 4.9 M, β -mea de 95 a 135 mM, a temperatura ambiente durante 4 a 8 horas, tal como 6 horas, en particular con una concentración de anticuerpos de aproximadamente 2.75 g/l.

35 En una realización, las condiciones robustas para llevar a cabo el método de la presente invención incluyen urea de 4.5 a 4.9 M, β -mea de 110 a 120 mM, a temperatura ambiente durante 4 a 8 horas, tal como 6 horas, en particular con una concentración de anticuerpo de aproximadamente 2.75 g/l.

40 En una realización, el método se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 20 a 25°C en presencia de β -mercaptoetilamina 115 mM y urea 4.7 M, durante un período de aproximadamente 6 horas. Ventajosamente, el rendimiento total de anticuerpos puede ser tan alto como 93%, en donde 76% o más del mismo es monómero.

La molécula de anticuerpo como se emplea en el presente documento se refiere a un anticuerpo (es decir, un anticuerpo completo) o un fragmento de unión del mismo.

45 El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos intactos (completos), es decir, que comprenden los elementos de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, moléculas que comprenden anticuerpos completos o un fragmento de unión de los mismos. El fragmento de unión como se emplea en el presente documento se refiere a la molécula similar al anticuerpo que comprende uno, dos, tres o más sitios de unión, en donde la molécula no contiene una cadena pesada o cadena ligera de longitud completa de un "anticuerpo completo". En una realización, el fragmento de unión no comprende un dominio(s) C_H2 y/o uno C_H3 . Los fragmentos de unión de los anticuerpos incluyen anticuerpos monocatenarios (es decir, una cadena pesada y una cadena ligera de longitud completa); Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, anticuerpos de dominio único (p. ej., VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi, tri o tetravalente, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (véase por ejemplo Holliger y Hudson, 2005, *Nature Biotech.* 23 (9): 1126-1136; Adair y Lawson, 2005, *Drug Design Reviews* - Online 2(3), 209-217), por ejemplo, los formatos FabFv descritos en la publicación internacional WO2009/040562 y versiones estabilizadas con disulfuro de los mismos como se describe en la publicación internacional WO2010/035012. La expresión "fragmento Fab" como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un fragmento de cadena ligera que comprende un dominio VL

(ligero variable) y un dominio constante de una cadena ligera (CL), y un dominio VH (pesado variable) y un primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada.

Los métodos para crear y fabricar fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpos para usar en la presente descripción incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las publicaciones internacionales WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171.

La molécula típica de Fab' comprende una pareja de una cadena pesada y una ligera en la que la cadena pesada comprende una región variable V_H, un dominio constante C_{H1} y una región bisagra y la cadena ligera comprende una región variable V_L y un dominio constante C_L. En una realización, se proporciona un dímero de un Fab', por ejemplo, la dimerización puede ser a través de la bisagra.

En una realización, la molécula de anticuerpo expresada de forma recombinante es una molécula de anticuerpo multiespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico o trispecífico. "Molécula biespecífica", como se emplea en el presente documento, se refiere a una molécula con dos sitios de unión a antígenos, que pueden unirse al mismo o a diferentes antígenos. "Molécula trispecífica", como se emplea en el presente documento, se refiere a una molécula con tres sitios de unión a antígenos, que pueden unirse al mismo o diferentes antígenos. "Anticuerpo multiespecífico" como se emplea en el presente documento se refiere a una molécula de anticuerpo como se describe en el presente documento que tiene dos o más dominios de unión, por ejemplo, dos o tres dominios de unión. En una realización, los dominios se unen todos al mismo antígeno, que incluye la unión al mismo epítipo en el antígeno o la unión a diferentes epítopos en el antígeno.

"Sitio de unión al antígeno", como se emplea en el presente documento, se refiere a una parte de la molécula, que comprende una pareja de regiones variables, en particular una pareja cognada, que interacciona específicamente con el antígeno objetivo. El sitio de unión, sitio de unión al antígeno, dominio de unión, dominio de unión al antígeno, se emplean indistintamente en el presente documento a menos que el contexto indique lo contrario.

Por tanto, en una realización, la molécula de anticuerpo comprende un dominio de unión. Un dominio de unión comprenderá generalmente 6 CDR, tres de una cadena pesada y tres de una cadena ligera. En una realización, 3 CDR de cada cadena están en una región armazón y junto con esa región armazón forman una región variable. Por tanto, en una realización, una molécula de anticuerpo comprende un dominio de unión específico para el antígeno que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada. El fragmento activo como se emplea en el presente documento es sinónimo de un fragmento de unión.

"Específicamente", como se emplea en el presente documento, pretende referirse a un sitio de unión al antígeno que solo reconoce el antígeno para el que es específico o un sitio de unión que tiene una afinidad de unión por el antígeno para el que es específico significativamente mayor en comparación con la afinidad por los antígenos para los que no es específico, por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor afinidad de unión. La afinidad de unión puede medirse por un ensayo convencional, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, tal como BIAcore.

Los restos en los dominios variables del anticuerpo se numeran de manera convencional de acuerdo con un sistema ideado por Kabat et al. Este sistema se expone en Kabat et al., 1987, en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., NIH, EE. UU. (de ahora en adelante "Kabat et al. (véase antes)"). Este sistema de numeración se utiliza en la presente memoria descriptiva, salvo que se indique lo contrario.

Las designaciones de restos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los restos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o más aminoácidos que en la numeración estricta de Kabat que corresponde a un acortamiento de, o inserción en, un componente estructural, ya sea una región armazón o determinante de complementariedad (CDR), de la estructura básica del dominio variable. La correcta numeración de restos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo dado mediante el alineamiento de restos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

Las CDR del dominio variable de la cadena pesada están ubicadas en los restos 31-35 (CDR-H1), restos 50-65 (CDR-H2) y restos 95-102 (CDR-H3) según el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M. *J. Mol. Biol.*, 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el resto 26 al resto 32. Por tanto, a menos que se indique lo contrario, "CDR-H1", como se emplea en el presente documento, pretende hacer referencia a los restos 26 a 35, como se describe por una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición de bucle topológico de Chothia.

Las CDR del dominio variable de la cadena ligera están ubicadas en los restos 24-34 (CDR-L1), restos 50-56 (CDR-L2) y restos 89-97 (CDR-L3) según el sistema de numeración de Kabat.

En el método de la presente invención, el anticuerpo comprende al menos un Fv (pareja VH/VL) con especificidad por un antígeno de interés en donde dichos VH y VL están conectados directa o indirectamente a través de uno o más conectores y están estabilizados por un enlace disulfuro entre ellos.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende un enlace disulfuro adicional, por ejemplo, en donde el disulfuro es un enlace disulfuro entre cadenas tal como entre la cadena pesada y la ligera y/o en donde en la región bisagra entre dos cadenas pesadas.

En una realización, la molécula de anticuerpo expresada de forma recombinante comprende uno o más, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis enlaces disulfuro. En una realización, los disulfuros se encuentran de forma natural. En una realización, uno o más disulfuros están diseñados para estar en una ubicación particular. En una realización, hay al menos un enlace disulfuro de origen natural y al menos un enlace disulfuro diseñado. Un enlace disulfuro diseñado como se emplea en el presente documento se refiere a donde uno o ambos azufres en los enlaces disulfuro se introdujeron por técnicas de ingeniería genética recombinante.

La posición del enlace disulfuro entre VH y VL no está limitada. Ejemplos de ubicaciones para enlaces disulfuro en los dominios variables incluyen, pero no se limitan a una posición seleccionada del grupo que comprende:

- V_H37 + V_L95C véase por ejemplo *Protein Science* 6, 781-788 Zhu et al. (1997);

- V_H44 + V_L100 véase, por ejemplo; *Biochemistry* 33 5451-5459 Reiter et al. (1994); o *Journal of Biological Chemistry* Vol. 269 No. 28 págs. 18327-18331 Reiter et al. (1994); o *Protein Engineering*, vol. 10, n° 12, págs. 1453-1459 Rajagopal et al. (1997);

- V_H44 + V_L105 véase por ejemplo *J Biochem.* 118, 825-831 Luo et al. (1995);

- V_H45 + V_L87 véase por ejemplo *Protein Science* 6, 781-788 Zhu et al. (1997);

- V_H55 + V_L101 véase por ejemplo *FEBS Letters* 377135-139 Young et al. (1995);

- V_H100 + V_L50 véase por ejemplo *Biochemistry* 29 1362-1367 Glockshuber et al. (1990);

- V_H100b + V_L49;

- V_H98 + V_L 46 véase por ejemplo *Protein Science* 6, 781-788 Zhu et al. (1997);

- V_H101 + V_L46;

- V_H105 + V_L43 véase, por ejemplo; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 90 págs. 7538-7542 Brinkmann et al. (1993); o *Proteins* 19, 35-47 Jung et al. (1994),

- V_H106 + V_L57 véase por ejemplo *FEBS Letters* 377135-139 Young et al. (1995)

y una posición o posiciones correspondientes a la misma en la pareja de la región variable ubicadas en la molécula.

Por consiguiente, en una realización, una pareja de dominios variables (VH/VL) de la presente invención se puede unir por un enlace disulfuro entre dos restos de cisteína, uno en VH y otro en VL, en donde la posición del par de restos de cisteína se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH100b y VL49, VH98 y VL46, VH101 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57. En una realización, el enlace disulfuro se forma entre las posiciones VH44 y VL100.

Las parejas de aminoácidos citadas anteriormente están en las posiciones propicias para el reemplazo por cisteínas, de modo que se puedan formar enlaces disulfuro. Las cisteínas se pueden diseñar en estas posiciones deseadas mediante técnicas conocidas. En una realización, por lo tanto, una cisteína diseñada de acuerdo con la presente descripción se refiere a donde el resto natural en una posición de aminoácido dada ha sido reemplazado con un resto de cisteína.

La introducción de cisteínas diseñadas se puede realizar usando cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis por superposición de extensión de PCR, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de casete (véase, en general, Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Ausbel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). Los kits de mutagénesis dirigida al sitio están disponibles en el mercado, p. ej. el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange® (Stratagen, La Jolla, CA). La mutagénesis de casete se puede realizar basándose en Wells et al., 1985, *Gene*, 34: 315-323. Alternativamente, pueden prepararse mutantes por síntesis génica total por reasociación, ligación y amplificación por PCR y clonación de oligonucleótidos que se superponen.

Generalmente, la pareja VH/VL, en donde VH y VL están conectados directa o indirectamente a través de uno o más conectores y están estabilizados por un enlace disulfuro entre ellos, es una pareja VH/VL complementaria que forma un sitio de unión al antígeno y se une al antígeno de manera cooperativa, es decir, una pareja VH/VL complementaria que tiene afinidad por el mismo antígeno y se une al antígeno de manera cooperativa. Normalmente serán una pareja VH/VL derivada del mismo anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo generado in vivo por un hospedante. Unir el antígeno de manera cooperativa como se emplea en el presente documento se refiere a las regiones variables que juntas unen

el antígeno diana específicamente.

En una realización, el anticuerpo comprende al menos un Fv en donde el VH no está fusionado en el extremo C con un dominio constante de cadena pesada CH1 y el VL no está fusionado en el extremo C con una región constante de cadena ligera CL (C kappa o C lambda).

- 5 Los dominios VH y VL son capaces de formar interacciones, que dan como resultado la formación de multímeros a través de interacciones con los dominios VH o VL en otras moléculas de anticuerpos.

En el Fv, los dominios VH y VL pueden estar conectados directamente entre sí mediante un conector o indirectamente mediante conectores a una o más moléculas adicionales. La conexión entre el VH y VL "fija" o define la relación entre una pareja VH y VL dada de tal manera que si dicho VH se empareja con un VL en otra molécula, se forma un multímero porque la relación entre el VH y VL originales se mantiene por la presencia de la conexión.

- 10

Por el contrario, en un Fv donde los dominios VH y VL no están conectados por uno o más conectores, los dominios VH y VL son capaces de "separarse" (también conocido como respiración) y cuando se vuelven a emparejar si uno de los dominios variables no es del emparejamiento original (pero tiene la misma secuencia que la región variable original a la que reemplaza), entonces la molécula solo se volverá a formar como un monómero.

- 15 El conector al que se hace referencia en la presente invención preferiblemente no es un enlace disulfuro. Los conectores adecuados para su uso en anticuerpos son bien conocidos en la técnica. El conector puede comprender uno o más aminoácidos. En una realización adicional, el conector es un conector peptídico que comprende de 2 a 40 aminoácidos, tal como 2 a 30, 2 a 20 o 2 a 10 aminoácidos. Los ejemplos de conectores peptídicos incluyen los descritos a continuación.

- 20 En una realización, el conector se selecciona de una secuencia mostrada en la secuencia 39 a 90.

Secuencias de conector de bisagra

SEQ ID NO:	SECUENCIA
39	DKTHTCAA
40	DKTHTCPPCPA
41	DKTHTCPPCPATCPPCPA
42	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
43	DKTHTCPPCP AGKPTL YNSL VMSDT AGTCY
44	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVMAEVDGTCY
45	DKTHTCCVECPPPCPA
46	DKTHTCPRCPKSCDTPPPCPRCPA
47	DKTHTCPSCPA

Secuencias de conector flexible

SEQ ID NO:	SECUENCIA
48	SGGGGSE
49	DKHTS
50	(S)GGGGS
51	(S)GGGGSGGGGS
52	(S)GGGGSGGGSGGGGS
53	(S)GGGGSGGGSGGGSGGGGS
54	(S)GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
55	AAAGSG-GASAS
56	AAAGSG-XGGGS-GASAS
57	AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS
58	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS
59	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
60	AAAGSG-XS-GASAS

SEQ ID NO:	SECUENCIA
61	PGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
62	ATTTGSSPGPT
63	ATTTGS
-	GS
64	EPSPGPISTINSPPSKESHKSP
65	GTVAAPSVFIFPPSD
66	GGGGIAPSMVGGGGS
67	GGGGKVEGAGGGGGS
68	GGGGSMKSHDGGGGS
69	GGGGNLITIVGGGGS
70	GGGGVVPSLPGGGGS
71	GGEKSIPGGGGS
72	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
73	YPRSIYIRRRHPSPSLTT
74	TPSHLSHILPSFGLPTFN
75	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
76	SPA AHFPR SIPRPGPIRT
77	APGPSAPSHRSLPSRAFG
78	PRNSIHFLHPLLVA PLGA
79	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
80	SPQYPSPLTLTLPPHPSL
81	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
82	LPWRTSLLPSLPLRRRP
83	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
84	VPPAPVVSLRSAHARPPY
85	LRPTPPRVRSYTCCTP-
86	PNVAHVLP LLTV PWDNLR
87	CNPLLPLCARSPAVRTFP
88	GGGGSGGGGTGGGGS

(S) es opcional en las secuencias 50 a 54.

Los ejemplos de conectores rígidos incluyen las secuencias peptídicas GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO: 89), PPPP (SEQ ID NO: 90) y PPP.

- 5 En un aspecto de la presente invención, Fv comprende un dominio VH y un dominio VL que están conectados directamente por un único conector. Los conectores adecuados para conectar directamente el dominio VH y el dominio VL se describen más arriba.

10 En una realización, VH y VL forman un fragmento variable monocatenario estabilizado con disulfuro, también denominado dsscFv, molécula que es un fragmento variable monocatenario con un péptido conector entre el dominio variable VH y VL y un enlace disulfuro entre dominios entre dichos VH y VL.

15 En esta realización, la molécula de dsscFv puede fusionarse con una o más moléculas adicionales, preferiblemente un segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo para formar anticuerpos bi, tri o tetravalentes. El dsscFv se fusiona con una o más moléculas adicionales mediante uno o más conectores que se pueden situar en el dominio VH, el dominio VL o tanto VH como VL. Por ejemplo, una o más moléculas de dsscFv pueden fusionarse con el extremo C o extremo N de una o más cadenas de un anticuerpo completo o fragmento de unión del mismo. Por ejemplo, dos o más moléculas de dsscFv pueden fusionarse entre sí para formar un diacuerpo, un scFv en tándem (bis-dsscFv) o un minicuerpo.

Los formatos de anticuerpos que pueden tener una propensión a multimerizar a través de una región Fv incluyen scFv,

diacuerpo, scFv en tándem, scFv-Fc en tándem, scFv-Fc, scFv-Fc-scFv Fab-scFv, scDiacuerpo, scDiacuerpo-Fc, scDiacuerpoCH3, IgG-scFv, scFv-IgG, IgG dos en uno, IgG de dominio V dual, IgG-V y V-Ig. Cuando se emplea un enlace disulfuro en el Fv o scFv para estabilizar estas construcciones, entonces puede ser beneficioso emplear el presente método para mejorar el rendimiento del monómero obtenido.

- 5 En un aspecto adicional de la presente invención, cada VH y VL comprende un conector que conecta indirectamente el VH y VL a través de una segunda molécula. En este aspecto, el dominio VH y el dominio VL están conectados a la segunda molécula a través de conectores separados. Conectores adecuados para unir cada dominio variable a la segunda molécula se han descrito anteriormente. La segunda molécula proporciona la conexión indirecta entre VH y VL. Cada VL y VH está unido a la segunda molécula en una posición adecuada con el fin de permitir que los dominios
10 VH y VL se unan al antígeno diana de forma cooperativa. El dominio VH y el dominio VL no están conectados directamente entre sí por un enlace peptídico o un conector peptídico.

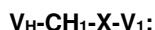
- En este aspecto, la segunda molécula es preferiblemente un segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo para formar anticuerpos bi, tri o tetravalentes. En una realización, los dominios VH y VL se unen indirectamente mediante un anticuerpo completo o un Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado o F(ab')₂. Por ejemplo, cuando el segundo anticuerpo es un Fab, el dominio VH puede fusionarse con el extremo C de la región constante de la cadena pesada, tal como el CH1 del segundo anticuerpo, y el anticuerpo de dominio único VL puede fusionarse con el extremo C de la región constante de la cadena ligera (C kappa o C lambda) del segundo anticuerpo, formando así un Fab-dsFv. Los anticuerpos Fab-dsFv se describen en detalle en los documentos WO2010/035012 y WO2011/036460.

- El anticuerpo puede comprender dominios de unión adicionales, por ejemplo, según la molécula de DVD-Ig estabilizada con disulfuro como se describe en la publicación internacional WO2011/117653, o el llamado (FabFv)₂Fc descrito en la publicación internacional WO2011/030107. Por tanto, el anticuerpo tal como se emplea en el presente documento incluye anticuerpos bi, tri o tetravalentes.

- Otros formatos de anticuerpos adecuados que se pueden emplear en el método de la presente invención se describen en la publicación internacional WO2011/030107 que describe anticuerpos FabFvFc y (FabFv)₂Fc, la publicación internacional WO2011/061492 que describe anticuerpos Fab-dsFv conjugados con PEG y la publicación internacional WO2011/086091 que describe Fab-dsFv-dsFv en donde se emplea un enlace disulfuro en el Fv o scFv.

- Otros formatos de anticuerpos adecuados que pueden emplearse en el método de la presente invención para mejorar el rendimiento de monómeros se describen en la publicación internacional WO2015/197772, que describe una molécula de anticuerpo multispecífico que comprende o consiste en:

- 30 a) una cadena polipeptídica de fórmula (I):



y

- b) una cadena polipeptídica de fórmula (II):



- 35 en donde:

V_H representa un dominio variable de cadena pesada;

CH₁ representa un dominio de una región constante de cadena pesada, por ejemplo el dominio 1 de la misma;

X representa un enlace o conector;

Y representa un enlace o conector;

- 40 V₁ representa un dsFv, un sdAb, un scFv o un dsscFv;

V_L representa un dominio variable de cadena ligera;

CL representa un dominio de una región constante de cadena ligera, tal como Ckappa;

V₂ representa un dsFv, un sdAb, un scFv o un dsscFv

en donde al menos uno de V₁ y V₂ es un dsscFv.

- 45 "Fragmento variable monocatenario" o "scFv" como se emplea en el presente documento se refiere a un fragmento variable monocatenario que comprende o consiste en un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio variable de la cadena ligera (VL) que está estabilizado por un conector peptídico entre los dominios variables VH y VL. Los dominios variables VH y VL pueden estar en cualquier orientación adecuada, por ejemplo, el extremo C de VH puede estar unido al extremo N de VL o el extremo C de VL puede estar unido al extremo N de VH.

"Fragmento variable monocatenario estabilizado con disulfuro" o "dsscFv" como se emplea en el presente documento se refiere a un fragmento variable monocatenario que está estabilizado por un conector peptídico entre el dominio variable VH y VL y también incluye un enlace disulfuro entre dominios entre VH y VL.

5 "Fragmento variable estabilizado con disulfuro" o "dsFv", como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento variable monocatenario que no incluye un conector peptídico entre los dominios variables VH y VL y en su lugar está estabilizado por un enlace disulfuro interdominio entre VH y VL. "Anticuerpo de dominio único" o "sdAb", como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio de anticuerpo variable monomérico único, tal como VH o VL o VHH. En la Figura 18 se muestran ejemplos de formatos de anticuerpos.

10 En una realización, tanto V1 como V2 son dsscFv y este formato de anticuerpo también se puede denominar en el presente documento como Fab-2xdsscFv. Los dominios variables VH y VL pueden estar en cualquier orientación adecuada, por ejemplo, el extremo C de VH puede estar unido al extremo N de VL o el extremo C de VL puede estar unido al extremo N de VH.

15 Otros formatos de anticuerpos adecuados que pueden emplearse en el método de la presente invención para mejorar el rendimiento de monómeros se describen en el Ejemplo 4 de la publicación internacional WO2013/068571, que describe un formato de anticuerpo Fab-dsscFv. En la Figura 19 se muestran ejemplos de formatos de anticuerpos.

En una realización, el anticuerpo no comprende un dominio CH2 y/o CH3.

En una realización, el fragmento de anticuerpo es el denominado formato Fab-dsFv, por ejemplo, como se describe en las publicaciones internacionales WO2010/035012 y WO2011/036460.

20 En una realización, el anticuerpo es un Fab estabilizado con disulfuro como se describe en la publicación internacional WO2011/117648. En una realización, el anticuerpo no es un Fab estabilizado con disulfuro como se describe en la publicación internacional WO2011/117648.

En una realización, el anticuerpo comprende un dominio de unión específico para OX40.

En una realización, el anticuerpo comprende un dominio de unión específico para la seroalbúmina.

25 En una realización, el anticuerpo comprende un dominio de unión específico para OX40 y un dominio de unión específico para la seroalbúmina, en particular un formato Fab-dsFv, tal como en donde el dominio de unión a la seroalbúmina es la porción Fv, en particular el anticuerpo biespecífico A26Fab-645dsFv específico para OX40 y la seroalbúmina humana descrita en la publicación internacional WO2013/068563

30 La presente descripción proporciona una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico que se une a OX40 humano y seroalbúmina humana que comprende:

una cadena pesada que comprende, en secuencia desde el extremo N, un primer dominio variable de cadena pesada (VH1), un dominio CH1 y un segundo dominio variable de cadena pesada (VH2),

una cadena ligera que comprende, en secuencia desde el extremo N, un primer dominio variable de cadena ligera (VL1), un dominio CL y un segundo dominio variable de cadena ligera (VL2),

35 en donde dichas cadenas pesadas y ligeras están alineadas de manera que VH1 y VL1 formar un primer sitio de unión al antígeno y VH2 y VL2 formar un segundo sitio de unión al antígeno,

en donde el antígeno unido por el primer sitio de unión al antígeno es OX40 humano y el antígeno unido por el segundo sitio de unión al antígeno es seroalbúmina humana, en particular

40 en donde el primer dominio variable de la cadena pesada (VH1) comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3 y el primer dominio variable de la cadena ligera (VL1) comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3,

45 en donde el segundo dominio variable de la cadena pesada (VH2) tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11 y el segundo dominio variable de la cadena ligera (VL2) tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 12 y el segundo dominio variable de la cadena pesada (VH2) y el segundo dominio variable de la cadena ligera (VL2) están unidos por un enlace disulfuro.

En una realización, hay un conector peptídico entre el dominio CH1 y el segundo dominio variable de la cadena pesada (VH2). En una realización, hay un conector peptídico entre el dominio CL y el segundo dominio variable de la cadena ligera (VL1). En una realización, el primer dominio variable de la cadena pesada (VH1) comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8. En una realización, el primer dominio variable de la cadena ligera (VL1) comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7. En una realización, la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15. En una realización, la cadena ligera comprende o consiste en la secuencia dada en la SEQ ID NO: 16.

- En una realización, la molécula de anticuerpo comprende un dominio de unión a la seroalbúmina, por ejemplo, que comprende una, dos tres CDR de la cadena pesada de la región variable mostrada en las SEQ ID NO: 29 o 30, y una, dos o tres CDR de la cadena ligera de la región variable mostrada en la SEQ ID NO: 31 o 32, en particular tres CDR de la cadena pesada de la región variable mostrada en las SEQ ID NO: 29 o 30, tales como CDRH1 para CDRH1, CDRH2 para CDH2, CDRH3 para CDH3 y tres CDR de la cadena ligera de la región variable mostrada en las SEQ ID NO: 31 o 32, tales como CDRL1 para CDRL1, CDRL2 para CDL2, CDRL3 para CDL3.
- En una realización, la molécula de anticuerpo comprende una región variable pesada mostrada en la SEQ ID NO: 30. En una realización, la molécula de anticuerpo comprende una región variable ligera mostrada en la SEQ ID NO: 32. En una realización, la molécula de anticuerpo comprende una región variable pesada mostrada en la SEQ ID NO: 30 y una región variable ligera mostrada en la SEQ ID NO: 32.
- En una realización, la cadena pesada comprende o consiste en la SEQ ID NO: 15 o 19. En una realización, la cadena ligera comprende o consiste en la SEQ ID NO: 16 o 20. En una realización, el fragmento de unión de la molécula de anticuerpo comprende las SEQ ID NO: 15 y 16, 15 y 20, 16 y 19 o 19 y 20. Por tanto, en una realización se proporciona una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico que se une a OX40 humano y seroalbúmina humana, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 16.
- En una realización, la molécula de anticuerpo, tal como un formato Fab-dsFv, es una descrita en la publicación internacional WO2014/019727.
- En una realización, la molécula de anticuerpo comprende un dominio de unión específico para la seroalbúmina humana, en particular con CDR o regiones variables como se describe en la publicación internacional WO2013/068571.
- En una realización, el anticuerpo o fragmento según la presente descripción es monoclonal. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica del hibridoma (Kohler y Milstein, *Nature*, 1975, 256, 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., *Immunology Today*, 1983, 4, 72) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole et al., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", págs. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).
- Las moléculas de anticuerpos empleadas en los métodos de la presente descripción también pueden generarse utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales clonando y expresando ADNc de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, por los métodos descritos por Babcook, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 (15), 7843-7848, publicaciones internacionales WO92/02551, WO2004/051268 y WO2004/106377.
- Las moléculas de anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región armazón de una molécula de inmunoglobulina humana que opcionalmente comprende uno o más restos donadores de la especie no humana (véase, por ejemplo, el documento US5 585 089). En una realización, las moléculas de anticuerpo que están sujetas al método de la presente descripción están humanizadas.
- Los anticuerpos empleados en los métodos de la presente invención también se pueden generar utilizando varios métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman et al., *J. Immunol. Methods*, 1995, 182, 41-50; Ames et al., *J. Immunol. Methods*, 1995, 184, 177-186; Kettleborough et al. *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 952-958.; Persic et al., *Gene*, 1997 187, 9-18; y Burton et al., *Advances in Immunology*, 1994, 57, 191-280; Publicaciones internacionales WO90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; WO93/11236; WO95/15982; y WO95/20401; y documentos US5 698 426; US5 223 409; US5 403 484; US5 580 717; US5 427 908; US5 750 753; US5 821 047; US5 571 698; US5 427 908; US5 516 637; US5 780 225; US5 658 727; US5 733 743; y US5 969 108.
- También se pueden usar ratones transgénicos u otros organismos, incluidos otros mamíferos, para generar anticuerpos humanizados, por ejemplo, usando tecnología de fagos.
- Los anticuerpos completamente humanos son aquellos anticuerpos en los que las regiones variables y las regiones constantes (cuando están presentes) tanto de las cadenas ligeras como pesadas son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, por los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente y anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de la región variable y/o constante de inmunoglobulina murina se han reemplazado por sus homólogos humanos, p. ej., como se describe en términos generales en los documentos EP0546073, US5 545 806, US5 569 825, US5 625 126, US5 633 425, US5 661 016, US5 770 429, EP 0438474 y EP0463151.
- El material de anticuerpo para usar en los métodos de la presente invención puede prepararse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante que implican la manipulación y reexpresión de ADN que codifica la región o regiones variable y constante del anticuerpo. Pueden usarse técnicas de biología molecular estándar para modificar, añadir o

eliminar aminoácidos o dominios según se desee. Cualquier alteración de las regiones variables o constantes todavía está abarcada por los términos regiones "variable" y "constante" como se usa en el presente documento.

El material de partida del anticuerpo puede obtenerse de cualquier especie, incluidos, por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, camello, llama, cabra o ser humano. Se pueden obtener partes del anticuerpo de más de una especie, por ejemplo, el anticuerpo puede ser quimérico. En un ejemplo, las regiones constantes son de una especie y las regiones variables de otra. El material de partida del anticuerpo también se puede modificar. En otro ejemplo, la región variable del anticuerpo se ha creado usando técnicas de ingeniería de ADN recombinante. Tales versiones de ingeniería incluyen las creadas, por ejemplo, a partir de regiones variables de anticuerpos naturales por inserciones, eliminaciones o cambios en o de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales. Los ejemplos particulares de este tipo incluyen aquellos dominios de región variable de ingeniería que contienen al menos una CDR y, opcionalmente, uno o más aminoácidos armazón de un anticuerpo y el resto del dominio de región variable de un segundo anticuerpo. Los métodos para crear y fabricar estos anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Boss et al., US4 816 397; Cabilly et al., US6 331 415; Shrader et al., WO92/02551; Ward et al., 1989, *Nature*, 341, 544; Orlandi et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 3833; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 322, 323; Bird et al., 1988, *Science*, 242, 423; Queen et al., US 5 585 089; Adair, WO91/09967; Mountain y Adair, 1992, *Biotechnol. Genet. Ing. Rev.*, 10, 1-142; Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181).

En una realización, el anticuerpo comprende una pareja de dominios variables que forman un dominio de unión que es una pareja cognada. La pareja cognada, como se emplea en el presente documento, pretende hacer referencia a una pareja natural de dominios variables, es decir, aislados de un solo anticuerpo o célula que expresa anticuerpo. Los dominios variables pueden haber sido optimizados y/o humanizados. Los dominios variables optimizados/humanizados derivados de una pareja cognada se seguirán considerando un pareja cognada después de la optimización/humanización.

Por tanto, la presente descripción se extiende a someter moléculas de anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos a los métodos descritos en el presente documento.

En una realización, la molécula de anticuerpo se une específicamente a un antígeno objetivo. Se une específicamente como se emplea en el presente documento se pretende que se refiera a moléculas que tienen alta afinidad por un antígeno o ligando objetivo (para el que son específicas) y que se unen a un antígeno o ligando para el que no son específicas con una afinidad baja o mucho menor (o en absoluto). Los expertos en la técnica conocen métodos para medir la afinidad e incluyen ensayos tales como BIAcore™.

El anticuerpo puede ser específico para cualquier antígeno objetivo. El antígeno puede ser una proteína asociada a células, por ejemplo, una proteína de superficie celular en células tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés también pueden ser cualquier proteína médicamente relevante, tales como las proteínas reguladas por aumento durante una enfermedad o infección, por ejemplo, receptores y/o sus ligandos correspondientes. Los ejemplos particulares de proteínas de superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo, integrinas tales como integrinas $\beta 1$, p. ej. VLA-4, E-selectina, P selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, CSF1 o CSF1-Receptor, DPCR1, DPCR1, dudulin2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA212659, LTB MAL2, MRP2, similar a nectina-2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de grasa de la leche humana (HMFG1 y 2), antígenos MHC Clase I y MHC Clase II, KDR y VEGF, PD-1, DC-SIGN, TL1A, DR3, receptor A de IL-7 y cuando sea adecuado, receptores de los mismos.

Los antígenos solubles incluyen interleuquinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-14, IL-16 o IL-17, tal como IL17A y/o IL17F, antígenos virales, por ejemplo, virus sincitial respiratorio o antígenos de citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral TNF (anteriormente conocido como factor de necrosis tumoral- α y denominado en el presente documento TNF o TNF α), factor de necrosis tumoral- β , factores estimuladores de colonias tales como G-CSF o GM-CSF y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α y PDGF- β , WISP-1 y cuando sea adecuado receptores de los mismos. Otros antígenos incluyen antígenos de superficie de células bacterianas, toxinas bacterianas, virus tales como influenza, EBV, HepA, B y C, agentes de bioterrorismo, radionucleidos y metales pesados, y venenos y toxinas de serpientes y arañas.

En una realización, el método comprende la etapa adicional de purificar una molécula de anticuerpo a un estándar adecuado para la administración a un ser humano y luego formular la misma.

Las moléculas de anticuerpo purificadas empleando los métodos descritos en el presente documento tienen una alta afinidad de unión, en particular, nanomolar o picomolar.

La afinidad se puede medir usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluido BIAcore™. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor, por ejemplo aproximadamente 50 pM o mejor, tal como aproximadamente 40 pM o mejor, en particular 30 pM o mejor. En

una realización, el anticuerpo o fragmento de unión es completamente humano o humanizado y tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor.

Un derivado de un dominio de origen natural como se emplea en el presente documento pretende hacer referencia a donde uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos en una secuencia de origen natural se han reemplazado o eliminado, por ejemplo para optimizar las propiedades del dominio tal como eliminando propiedades indeseables pero en donde se retienen la(s) propiedad(es) características del dominio.

Un experto en la técnica también entenderá que el anticuerpo puede sufrir una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y extensión de estas modificaciones a menudo depende de la línea de células hospedantes utilizada para expresar la molécula, así como de las condiciones de cultivo. Tales modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un resto básico carboxi-terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. *Journal of Chromatography* 705: 129-134, 1995). Estos cambios postraduccionales pueden influir en las propiedades de la molécula y, por tanto, repercutir en el procesamiento posterior.

En una realización, la composición de anticuerpo empleada en el método de la presente descripción no comprende acetato de sodio, por ejemplo, en una concentración de 25 mM. En una realización, la composición de anticuerpo empleada en el método de la presente descripción no comprende cloruro de sodio, por ejemplo, en una concentración de 25 mM.

En una realización, la etapa de conversión según la presente descripción se realiza en el líquido sobrenadante clarificado. El líquido sobrenadante puede clarificarse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, centrifugación, filtración o similares. En una realización, el líquido sobrenadante se clarifica empleando una filtración de 0.22 micrómetros.

En una realización, se lleva a cabo una etapa de cromatografía de proteína A en el líquido sobrenadante antes de la etapa de conversión térmica. La purificación con proteína A es particularmente ventajosa en el contexto del tipo de moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento (en particular, aquellas que no comprenden dominios CH2CH3) porque esta técnica permite que los multímeros se resuelven de los monómeros.

El uso de cromatografía de proteína A puede usarse para recuperar un anticuerpo que contiene el dominio VH3 humano que no comprende una región Fc en forma monomérica. Se ha observado un efecto de avidez entre la unión de dominios VH3 humanos y la proteína A. Este hallazgo es sorprendente dado que no se ha descrito la interacción entre regiones Fc y la proteína A y permite la recuperación de anticuerpos monoméricos que contienen el dominio VH3 humano a partir de una mezcla que contiene formas monoméricas y multiméricas del anticuerpo.

En consecuencia, la etapa de purificación con proteína A puede comprender a) aplicar una mezcla que comprende un anticuerpo que contiene el dominio VH3 humano en forma monomérica y multimérica a un material de cromatografía de proteína A en donde dicha proteína A comprende el dominio D y/o E, en condiciones que permitan la unión de dicho anticuerpo a la proteína A, y b) recuperar el anticuerpo que contiene el dominio VH3 humano en forma monomérica, en donde el anticuerpo que contiene el dominio VH3 humano no contiene una región Fc. Alternativamente, la etapa de purificación con proteína A comprende a) aplicar una mezcla que comprende un anticuerpo que contiene el dominio VH3 humano en forma monomérica y multimérica a un material de cromatografía de proteína A en donde dicha proteína A comprende el dominio D y/o E, b) permitir la unión de dicho anticuerpo a la proteína A, c) aplicar un tampón de elución que altera selectivamente la unión del anticuerpo en forma monomérica, d) recuperar el eluido resultante y, opcionalmente e) aplicar un segundo tampón de elución que altera la unión del anticuerpo en forma multimérica y recuperar este segundo eluido, en donde el anticuerpo que contiene el dominio VH3 humano no contiene una región Fc. En una realización, en donde el anticuerpo es el anticuerpo A26Fab-645dsFv específico para OX40 y la seroalbúmina humana descrita en el documento WO2013/068563, la purificación con proteína A se lleva a cabo como antes, en donde en la etapa c) el tampón de elución tiene un pH de 3.5 a pH de 4.2, preferiblemente de pH 3.6 a pH 4.1, de pH 3.7 a pH 4.0, preferiblemente de pH 3.8 a pH 3.9, o pH 3 para alterar la unión del monómero y en la etapa opcional e) el tampón de elución tiene un pH por debajo de 3.5, preferiblemente por debajo de pH 3.4, preferiblemente de pH 2.8 a pH 3.2, preferiblemente de pH 2.9 a pH 3.1, preferiblemente pH 3.0 que altera la unión del anticuerpo en forma multimérica.

Alternativamente, la etapa de purificación con proteína A comprende a) aplicar una mezcla que comprende un anticuerpo que contiene el dominio VH3 humano en forma monomérica y multimérica a un material de cromatografía de proteína A en donde dicha proteína A comprende el dominio D y/o E, b) permitir la unión del anticuerpo en forma multimérica, c) recuperar el anticuerpo en forma monomérica en el flujo continuo y opcionalmente d) aplicar un tampón de elución que altera selectivamente la unión del anticuerpo en forma multimérica, y e) recuperar el eluido resultante de d); en donde el anticuerpo que contiene el dominio VH3 humano no contiene una región Fc.

En una realización alternativa, no se lleva a cabo cromatografía de proteína A antes de la etapa de conversión.

En una realización, el método comprende una etapa de procesamiento subsiguiente adicional. En una realización, el método comprende la etapa adicional de purificación subsiguiente, por ejemplo en donde el procesamiento subsiguiente comprende una etapa de cromatografía, tal como cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía

de intercambio iónico.

Una etapa de procesamiento subsiguiente significa que se emplea al menos una etapa posteriormente a la realización del tratamiento con urea o guanidina y agente reductor para purificar adicionalmente la molécula de anticuerpo. Los ejemplos de procesamiento posterior incluyen una o más etapas de cromatografía, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico (tal como cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de intercambio catiónico), cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, tal como cromatografía de proteína-A (tal como una columna MabSelect). Las técnicas empleadas en el procesamiento posterior de polipéptidos y proteínas son bien conocidas por los expertos en la técnica.

En una realización, el procesamiento subsiguiente comprende una etapa de cromatografía, en particular cromatografía de intercambio iónico. En una realización, el método comprende una etapa cromatográfica de intercambio aniónico seguida de una etapa cromatográfica de intercambio catiónico o viceversa. En una realización, se emplea la cromatografía de interacción hidrófoba. En una realización, se emplea cromatografía en modo mixto. En una realización, se emplean múltiples etapas de cromatografía.

En una realización, el método comprende una etapa de inactivación del virus, por ejemplo, manteniendo la composición que contiene la proteína a un pH definido, por ejemplo, un pH bajo durante un período definido. En una realización, la etapa final de procesamiento subsiguiente es la etapa de diafiltración y de intercambio de tampón para proporcionar el tampón de almacenamiento final y la concentración para la proteína.

En una realización, el procesamiento subsiguiente comprende la purificación con proteína A (tal como la columna MabSelect), como se describió anteriormente antes de la etapa de conversión.

En una realización, el procesamiento subsiguiente comprende además una etapa de inactivación viral, seguida de ultrafiltración e intercambio de tampón, seguida a su vez de cromatografía de intercambio aniónico y posterior cromatografía de intercambio catiónico y una etapa de filtración viral.

En una realización, el procesamiento subsiguiente que sigue a la etapa de conversión comprende una etapa de inactivación viral, seguida de ultrafiltración e intercambio de tampón, seguida a su vez por cromatografía de intercambio aniónico y posterior cromatografía de intercambio catiónico y una etapa de filtración viral.

En una realización, el procesamiento subsiguiente comprende además un paso de inactivación viral, seguido de ultrafiltración e intercambio de tampón, seguido a su vez por cromatografía de intercambio catiónico y posterior cromatografía de intercambio aniónico y una etapa de filtración viral.

Otras etapas de procesamiento subsiguientes incluyen la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) o la cromatografía de modo mixto.

En una realización, la etapa final de procesamiento subsiguiente es la etapa de diafiltración y el intercambio de tampón para proporcionar el tampón de almacenamiento final y la concentración para la proteína.

En una realización, el método descrito en el presente documento proporcionaba la etapa adicional de conjugar una molécula de anticuerpo monomérico purificado con una o más moléculas efectoras. La molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de dichas moléculas unidas de modo que formen un único motivo que se puede unir a la molécula de anticuerpo.

Cuando se desee obtener un anticuerpo unido a una molécula efectora, este se puede preparar por procedimientos químicos convencionales o de ADN recombinante en los que el anticuerpo se une directamente o mediante un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras con un anticuerpo son bien conocidas en la técnica (véase, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2ª Ed., Robinson et al., Eds., 1987, págs. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en las publicaciones internacionales WO93/06231, WO92/22583, WO89/00195, WO89/01476 y WO03031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido, la unión se puede lograr usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe en los documentos WO86/01533 y EP0392745.

El término molécula efectora como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o naturales, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p. ej. ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse por espectroscopía de NMR o ESR.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos, incluido cualquier agente que sea perjudicial (p.ej. mata) para las células. Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina,

doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desdihidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos.

5 Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a antimetabolitos (p. ej. metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracildecabazina), agentes alquilantes (p. ej. mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej. daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej. dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramycin (AMC), calicheamicinas o duocarmicinas) y agentes antimitóticos (p. ej. vincristina y vinblastina).

10 Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y tungsteno 188 /Renio 188 ; o fármacos tales como, pero no limitados a alquilfosfolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

15 Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador del plasminógeno tisular, un agente trombotico o un agente antiangiogénico, p. ej., angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como una linfoquina, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

25 Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en el diagnóstico. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleidos radiactivos, metales emisores de positrones (para uso en tomografía por emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general el documento US4 741 900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficeitrina; materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y nucleidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

35 En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o potenciar el suministro de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en la publicación internacional WO05/117984.

Cuando la molécula efectora es un polímero puede ser, en general, un polímero sintético o natural, por ejemplo un polímero de polialquileño, polialquilenilo o polioxialquilenilo de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, p. ej. un homo o heteropolisacárido.

40 Los sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxí, metilo o metoxi.

45 Los ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados del mismo. Los polímeros de origen natural específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos.

"Derivados", como se usa en el presente documento, pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos de tiol tales como maleimidas y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o mediante un segmento conector al polímero. Se apreciará que el resto de dicho grupo en algunos casos formará parte del producto como el grupo de unión entre el anticuerpo de la descripción y el polímero.

50 El tamaño del polímero se puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular medio de 500 Da a 50 000 Da, por ejemplo de 5000 a 40 000 Da, tal como de 20 000 a 40 000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse, en particular, basado en el uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad de localizarse en ciertos tejidos, tales como los tumores o de prolongar la semivida en la circulación (para revisión véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Así, por ejemplo, cuando el producto esté destinado a salir de la circulación y penetrar en el tejido, por ejemplo, para usar en el tratamiento de un tumor, puede resultar ventajoso utilizar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones donde el producto permanece en la circulación, puede resultar ventajoso utilizar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo, que tenga un peso molecular en el intervalo de 20 000 Da a 40 000

Da. Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15 000 Da a aproximadamente 40 000 Da.

En un ejemplo, un anticuerpo para usar en la presente invención se une a motivos de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, las moléculas de PEG pueden unirse a través de cualquier grupo funcional aminoácido terminal o de cadena lateral de aminoácido disponible ubicado en el anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Dichos aminoácidos pueden encontrarse de forma natural en el anticuerpo o pueden modificarse genéticamente en el anticuerpo utilizando métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo los documentos US5 219 996; US5 667 425; WO98/25971). En un ejemplo, la molécula de la presente invención es un anticuerpo modificado en donde la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. Se pueden usar múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG. En una realización, una molécula de PEG se une a una cisteína 171 en la cadena ligera, por ejemplo, véase la publicación internacional WO2008/038024.

De manera adecuada, las moléculas de PEG se unen covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un resto de cisteína situado en el anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al anticuerpo modificado puede unirse covalentemente al átomo de azufre de un resto de cisteína situada en el anticuerpo. El enlace covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión, se pueden usar moléculas efectoras apropiadamente activadas, por ejemplo, derivados selectivos de tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína. Puede usarse un polímero activado como material de partida en la preparación del anticuerpo modificado con polímero como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo con tiol tal como un ácido o éster α -halocarboxílico, p. ej. yodoacetamida, una imida, p. ej. maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Tales materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles comercialmente usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina 20K (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

En un aspecto, la presente descripción describe una molécula de anticuerpo obtenida u obtenible a partir del método descrito en el presente documento.

La presente descripción también describe un método que comprende la etapa adicional de formular la molécula de anticuerpo obtenida a partir del método de representación que incluye versiones conjugadas del mismo, como una formulación farmacéutica adecuada para su uso en seres humanos.

Por tanto, la presente descripción también describe una etapa del procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar el anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La molécula de anticuerpo obtenida del método de la presente descripción puede ser el único principio activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede ir acompañada de otros principios activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1 β , anti-células T, anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes que no son anticuerpos tales como xantinas. Otros principios activos adecuados incluyen anticuerpos capaces de inducir tolerancia, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

En una realización adicional, el anticuerpo o composición según la descripción se emplea en combinación con otro agente farmacéuticamente activo, por ejemplo, un corticosteroide (tal como propionato de fluticasona) y/o un agonista beta-2 (tal como salbutamol, salmeterol o formoterol) o inhibidores del crecimiento y proliferación celular (tales como rapamicina, ciclofosfamida, metotrexato) o un inhibidor alternativo de CD28 y/o CD40. En una realización, el inhibidor es una molécula pequeña. En otra realización, el inhibidor es un anticuerpo específico para el objetivo.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de forma adecuada una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección a la que va dirigido, o para presentar un efecto terapéutico o preventivo detectable. La cantidad terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, normalmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también se puede utilizar para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración apropiados. Luego, dicha información puede usarse para determinar dosis útiles y vías para la administración en seres humanos.

La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, la combinación o combinaciones de fármacos, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse por experimentación rutinaria y está dentro del criterio del médico. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0.01 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo de 0.1 mg/kg a 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en formas de dosis unitarias que

contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación (p.ej., simultáneamente, secuencialmente o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

5 La dosis a la que se administra un anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección que se va a tratar, por ejemplo, la extensión de la enfermedad/inflamación presente y de si la molécula se usa profilácticamente o para tratar una afección existente.

10 La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida del anticuerpo y la duración de su efecto. Si el anticuerpo tiene una semivida corta (p. ej., de 2 a 10 horas), puede ser necesario administrar una o más dosis al día. Alternativamente, si el anticuerpo tiene una semivida prolongada (p. ej., de 2 a 15 días), puede que solo sea necesario administrar una dosis una vez al día, una vez a la semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.

El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, de metabolización lenta, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas virales inactivas.

15 Pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como hidroclozuros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

20 Los vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Además, en tales composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH. Dichos vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas y suspensiones, para que ingiera el paciente.

25 Las formas adecuadas para la administración incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, p. ej. por inyección o infusión, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede tener la forma de suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de la descripción puede estar en forma seca, para su reconstitución antes de usar con un líquido estéril apropiado.

30 Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más realizaciones, las composiciones están adaptadas para su administración a sujetos humanos.

De forma adecuada, en las formulaciones de acuerdo con la presente descripción, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoelectrico del anticuerpo, por ejemplo, si el pH de la formulación es 7, entonces un pl de 8-9 o superior puede ser apropiado. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se cree que esto puede proporcionar finalmente una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo, el anticuerpo permanece en solución.

35 Las composiciones farmacéuticas de esta descripción pueden administrarse por cualquier número de vías que incluyen, pero no se limitan a vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase la publicación internacional WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden usar hipopulverizaciones para administrar las composiciones farmacéuticas de la descripción. Normalmente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

La administración directa de las composiciones se realizará generalmente por inyección, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o administrada al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. El tratamiento de dosis puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple.

45 Se apreciará que el principio activo de la composición será un anticuerpo. Como tal, será susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. Por tanto, si la composición se va a administrar por una vía que usa el tracto gastrointestinal, la composición deberá contener agentes que protejan al anticuerpo de la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez que se haya absorbido del tracto gastrointestinal.

50 Una descripción detallada de los vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

En una realización, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas, incluida la inhalación.

Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles dosificadores que contienen gases propulsores o soluciones inhalables sin gases propulsores. Los polvos inhalables de acuerdo con la descripción que

contienen la sustancia activa pueden consistir únicamente en las sustancias activas mencionadas anteriormente o en una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con un excipiente fisiológicamente aceptable.

Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (p. ej., glucosa o arabinosa), disacáridos (p. ej., lactosa, sacarosa, maltosa), oligo y polisacáridos (p. ej., dextranos), polialcoholes (p. ej., sorbitol, manitol, xilitol), sales (p. ej., cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Se utilizan adecuadamente mono o disacáridos, se usa lactosa o glucosa, en particular, pero no exclusivamente, en forma de sus hidratos.

Las partículas para la deposición en el pulmón requieren un tamaño de partículas inferior a 10 micrómetros, tal como 1-9 micrómetros, por ejemplo, de 0.1 a 5 µm, en particular de 1 a 5 µm. El tamaño de partículas del principio activo (tal como el anticuerpo) es de primordial importancia.

Los gases propulsores que pueden usarse para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propulsores adecuados se seleccionan de entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano y halohidrocarburos tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propulsores mencionados anteriormente se pueden utilizar solos o en mezclas de los mismos.

Los gases propulsores particularmente adecuados son derivados de alcanos halogenados seleccionados de entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados mencionados anteriormente, TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y sus mezclas son particularmente adecuados.

Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor también pueden contener otros ingredientes tales como codisolventes, estabilizantes, agentes tensioactivos (surfactantes), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la técnica.

Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor según la presente descripción pueden contener hasta un 5% en peso de sustancia activa. Los aerosoles según la presente descripción contienen, por ejemplo, de 0.002 a 5% en peso, de 0.01 a 3% en peso, de 0.015 a 2% en peso, de 0.1 a 2% en peso, de 0.5 a 2% en peso o de 0.5 a 1% en peso de principio activo.

Alternativamente, las administraciones tópicas al pulmón también pueden ser por administración de una formulación en solución o suspensión líquida, por ejemplo, empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (p. ej., el nebulizador Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor Pari Master(R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

El anticuerpo o fragmento de unión obtenido a partir del método del presente documento puede administrarse disperso en un disolvente, p. ej., en forma de una solución o una suspensión. Se puede suspender en una solución fisiológica apropiada, p. ej., solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en la técnica pueden contener de 0.05 mg a 0.15 mg de edetato de disodio, de 8.0 mg a 9.0 mg de NaCl, de 0.15 mg a 0.25 mg de polisorbato, de 0.25 mg a 0.30 mg de ácido cítrico anhidro y de 0.45 mg a 0.55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua para lograr así un pH de aproximadamente 4.0 a 5.0. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, la molécula liofilizada.

Las suspensiones o formulaciones en solución terapéuticas también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen tampones (p. ej., tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (p. ej., seroalbúmina), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones pueden encapsularse en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación se proporcionará generalmente en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.

Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración del disolvente/solución tamponada usados para la formulación, suspensión aséptica de la molécula en la solución de disolvente tamponada estéril y dispensación de la formulación en receptáculos estériles por métodos familiares para los expertos en la técnica.

La formulación nebulizable según la presente descripción se puede proporcionar, por ejemplo, como unidades de dosis única (p. ej., envases o viales de plástico sellados) envasados en sobres de papel de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, p. ej., 2 ml, de disolvente/tampón de solución.

Ejemplo 1: Preparación del material de la molécula de anticuerpo

Expresión en CHO y clarificación de A26Fab-645dsFv

Las construcciones que se unen a OX40 y seroalbúmina humanas que tienen la secuencia de la cadena ligera A26 Fab Ligera-(3xG4S)-645dsFv(gL4) (SEQ ID NO: 16) y la secuencia de la cadena pesada A26 Fab Pesada-(G4S,G4T,G4S)-645dsFv(gH5) (SEQ ID NO: 15) se expresó en una línea celular de ovario de hámster chino estable deficiente en dihidrofolato reductasa (DHFR) (CHO DG44). Esta se generó mediante transfección usando un Nuclefactor (Lonza) siguiendo las instrucciones del fabricante con un vector plasmídico que contenía tanto el gen para DHFR como marcador seleccionable como los genes que codifican el producto. Las células transfectadas se

seleccionaron en medio que carecía de hipoxantina y timidina, y en presencia del inhibidor de DHFR metotrexato.

La línea celular se cultivó en medio que contenía metotrexato 20 nM a lo largo de las etapas de inóculo. A continuación, las células se cultivan en ausencia de metotrexato. Para la etapa de cultivo final, las células se cultivaron en un biorreactor de acero inoxidable de 80 l durante 14 días en medio en ausencia de metotrexato. El contenido del biorreactor el día 14 se recogió por centrifugación en pila de discos, seguido de múltiples etapas de filtración para producir el líquido sobrenadante clarificado.

Purificación con proteína A de A26Fab-645dsFv expresado en mamíferos

Los líquidos sobrenadantes de CHO clarificados se aplicaron a 9.4 ml de resina de cromatografía MabSelect HiScreen (2 columnas en serie) (GE Healthcare) empaquetada en un intervalo de tamaños de columna según la escala requerida. Las columnas se equilibraron en solución salina tamponada con fosfato Delbeccos (PBS) pH 7.4, o en fosfato sódico 100 mM, NaCl 150 mM pH 7.4. La columna se lavó con PBS, el tampón de equilibrio después de la carga. Y después, el material unido se eluyó con tampón de citrato de sodio 0.1 M a pH 3.4. Se ajustó el pH del pico de elución recogido a ~pH7 con Tris/HCl 2 M pH 8.5. En las eluciones de pH ajustado se llevó a cabo intercambio de tampón en tampón de fosfato PBS a pH 7.4 usando concentradores de centrifugación de corte de peso molecular de 10 kDa o membranas de ultrafiltración de flujo tangencial.

Ejemplo 2: Efecto de reductor solo y de combinación de reductor y desnaturizante en el rendimiento de monómeros

Solo reductor

La alimentación era anticuerpo purificado como se proporciona en el Ejemplo 1, concentración 1 g/l y 15% de monómero. El experimento se realizó a temperatura ambiente en Eppendorfs con un volumen de alimentación de 1 ml. El reductor utilizado era β -mea 50 mM. Antes de realizar cualquier análisis, se realizó el intercambio de tampón de las muestras con PBS para eliminar el reductor.

El porcentaje de monómero se analizó durante un período de 0 a 23 horas.

Tabla 1: El porcentaje de monómero después del tratamiento con β -mea 50 mM

Tiempo (h)	Concentración de molécula de anticuerpo en g/l	% de monómero
0	14.8	25.2
1	14.8	25.1
2	14.8	25.0
3	14.8	24.9
4	14.9	25.1
5	14.9	25.0
6	14.9	25.1
23	14.9	25.0

Combinación de reductor y desnaturizante

La alimentación era anticuerpo purificado como se proporciona en el Ejemplo 1, concentración 1.1 g/l y 14% de monómero.

Se utilizó urea 3 M como desnaturizante y β -mea 50 mM como reductor. La urea se añadió primero a la alimentación, seguida del reductor. Después de la adición del reductor, se tomaron muestras en puntos de tiempo de hasta 5 horas, el primero inmediatamente después de la adición de β -mea (marcado 0 h). Se hizo el intercambio de tampón de cada muestra y luego se analizó por SE UPLC. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

Los resultados se muestran en la Tabla 2:

Tiempo (h)	% Área por SE-UPLC					Cantidad total de proteína (ug)	Cantidad de monómero (ug)
	% HMWS	% Tetrámero	% Trímero	% Dímero	% Monómero		
0.0	29.7	16.8	20.5	18.9	14.2	1.1	0.2
0.5			3.5	8.6	76.6	0.8	0.6
1.0	0.5	0.5	2.1	8.5	80.3	0.8	0.7
1.5	0.7		2.4	7.6	83.2	0.9	0.7

2.0	0.8	0.5	2.0	8.3	82.6	1.0	0.8
3.0	1.2	0.6	2.0	8.4	82.3	0.9	0.7
5.0	1.8	0.6	2.5	8.7	80.7	0.9	0.8
HMWS = especies de alto peso molecular							
Se utilizó el análisis por SE-HPLC para determinar el % de monómero y la cantidad de monómero, véase también la Figura 1.							

Puede verse que el uso de urea 3 M como desnaturalizante y de β -mea 50 mM proporcionó un porcentaje significativamente mejorado de monómero al mismo tiempo que también aumentaba la cantidad de monómero. La urea era capaz de lograr la conversión de multímeros en monómeros sin reducir el enlace disulfuro entre las cadenas pesadas de Fab.

Conclusión: β -mea se identificó como el reductor óptimo para la reacción de conversión con el fin de reducir el enlace disulfuro intercadena de Fv a la vez que se retiene el enlace disulfuro intercadena de Fab. Otro reductor ensayado (datos no mostrados) parecía aumentar el % de monómero por análisis de SE pero, como se vio en el análisis de SDS PAGE posterior, reducen ambos enlaces disulfuro entre cadenas, por lo que no son útiles en la conversión de Fab-dsFv.

Combinación de reductor y desnaturalizante con concentraciones variables:

Se llevó a cabo un experimento de selección variando la concentración de desnaturalizante y reductor con el fin de identificar las condiciones óptimas para convertir especies multiméricas en monómeros. La alimentación era anticuerpo purificado como se proporciona en el Ejemplo 1. Cada experimento se realizó a temperatura ambiente, con una velocidad de mezcla de 1200 rpm, una concentración de alimentación de 1.1 g/l y un volumen de muestra de 5 ml. La urea se añadió primero a la alimentación, seguida rápidamente por el reductor. Se tomaron muestras de la evolución temporal de 0 a 5 horas. Las muestras se congelaron inmediatamente a -20°C al final de la etapa de conversión. 1 día después, las muestras se filtraron por 0.22 μ m y se analizaron por SE UPLC. La reacción de conversión continuó hasta el análisis porque todavía estaban presentes el desnaturalizante y el reductor. Los desnaturalizantes ensayados eran urea e hidrocloreuro de guanidina (GuHCl)

Tabla 3: Plan experimental para una combinación de desnaturalizante y reductor

Concentración de β -MEA (mM)	Concentración desnaturalizante (M)	
	Urea	GuHCl
0	1.0	1.0
10	1.0	1.0
50	1.0	1.0
0	3.0	1.8
10	3.0	1.8
50	3.0	1.8
0	5.0	2.5
10	5.0	2.5
50	5.0	2.5

Los resultados de la cromatografía de exclusión por tamaño realizada en las muestras se muestran en las Figuras 2A-E.

La guanadina 1 M con β -mea 10 mM daba el mayor rendimiento de monómero (véase la Figura 2B).

Se observó 81% de monómero en la muestra de urea 3 M y β -mea 50 mM (véase la Figura 2C). Incluso con β -mea sólo 10 mM se observó 77% de monómero en la muestra de urea 3 M (Figura 2C). Las muestras de urea 1 M todavía tenían un aumento significativo en el % de monómero, pero menor % de monómero en comparación con las muestras de urea 3 M.

Como se muestra en las Figuras 2 D y 2 E, que muestran el % de rendimiento y la concentración de monómero, con urea 3 M, β -mea 50 mM había 84.7% de rendimiento y 0.79 g/l de monómero después de 2 h (5 veces mayor que la alimentación). También había altas recuperaciones de monómeros en las muestras de urea 3 M, β -mea 10 mM y de urea 1 M, β -mea 50 mM. La urea 5 M dio como resultado alguna pérdida de producto en estas muestras.

Conclusión: Los resultados usando urea 3 M como desnaturalizante eran muy prometedores y proporcionaban un aumento de 5 veces en el monómero, mientras que se observaba un aumento de 4 veces en el monómero con guanidina.

Ejemplo 3: Evolución temporal de la conversión de urea

Se realizó un estudio de la evolución temporal para la conversión de urea en la columna de SE UPLC. La alimentación era anticuerpo purificado como se proporciona en el Ejemplo 1. Se prepararon dos muestras en viales de 1.5 ml y se procesaron en una columna de SE UPLC. Se añadió primero la urea a la alimentación, seguida rápidamente por el reductor. Los puntos de tiempo se realizaron cada 40 minutos. Las condiciones para las muestras eran:

- concentración de la alimentación 0.5 g/l, concentración de β -mea 20 mM, pH 8.6, concentración de urea 4 M

- concentración de la alimentación 5.0 g/l, concentración de β -mea 100 mM, pH 5.4, concentración de urea 4 M

La temperatura del compartimento de la muestra se fijó en 10°C, lo que habría reducido la velocidad de la reacción con respecto a la reacción a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos del análisis de SE-UPLC se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 4: Selección de parámetros - 1

Con el fin de encontrar las condiciones óptimas para la etapa de conversión donde se usa β -mea como reductor y urea como desnaturalizante, se investigaron los parámetros que se cree que tienen el mayor efecto en la reacción de conversión. Estos eran la concentración de la alimentación, concentración de urea, concentración de β -mea y pH, véase la tabla 3. La alimentación era anticuerpo purificado como se proporciona en el Ejemplo 1. El material de alimentación contenía 15% de monómero y el tiempo utilizado para todas las etapas de conversión era de 5 horas. Se añadió primero la urea a la alimentación, seguida rápidamente por el reductor.

Tabla 4: Intervalos de los parámetros seleccionados

Factores	Niveles
Concentración de la alimentación	0.5 - 5 g/l
Concentración de β -mea	20 - 100 mM
Concentración de urea	0.5 - 4 M
pH	5.4 - 8.6

Las etapas de conversión se realizaron en una placa de 96 pocillos profundos, se repitió cada experimento y los experimentos se prepararon utilizando el robot TECAN. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente y las muestras se analizaron por SE UPLC. Las respuestas medidas eran % de monómero, rendimiento total y rendimiento de monómero.

El diseño experimental se muestra en la Tabla 5:

Nombre del exp.	Conc. de alimentación (g/l)	pH	Conc. de β -mea (mM)	Conc. de urea (M)
N1	0.5	5.4	20	0.5
N2	5.0	5.4	20	0.5
N3	0.5	8.6	20	0.5
N4	5.0	8.6	20	0.5
N5	0.5	5.4	100	0.5
N6	5.0	5.4	100	0.5
N7	0.5	8.6	100	0.5
N8	5.0	8.6	100	0.5
N9	0.5	5.4	20	4.0
N10	5.0	5.4	20	4.0
N11	0.5	8.6	20	4.0
N12	5.0	8.6	20	4.0
N13	0.5	5.4	100	4.0
N14	5.0	5.4	100	4.0
N15	0.5	8.6	100	4.0
N16	5.0	8.6	100	4.0
N17	2.75	7.0	60	2.25

N18	2.75	7.0	60	2.25
N19	2.75	7.0	60	2.25

Las muestras se analizaron por SE-HPLC y los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Resultados de la 1ª selección de intervalos de parámetros

Nombre del exp.	Concentración de alimentación (g/l)	pH	Reductor (mM)	Urea (M)	Muestras no filtradas		
					Monómero (%)	Rendimiento (%)	Rendimiento de monómero (%)
N1	0.5	5.4	20	0.5	24.0	114.0	27.4
N2	5.0	5.4	20	0.5	22.4	110.0	25.3
N3	0.5	8.6	20	0.5	23.0	107.8	28.8
N4	5.0	8.6	20	0.5	24.2	103.4	27.9
N5	0.5	5.4	100	0.5	26.8	106.1	52.4
N6	5.0	5.4	100	0.5	27.9	107.4	50.7
N7	0.5	8.6	100	0.5	27.0	97.8	55.2
N8	5.0	8.6	100	0.5	29.7	94.4	57.1
N9	0.5	5.4	20	4.0	49.4	99.8	22.3
N10	5.0	5.4	20	4.0	49.1	93.6	22.6
N11	0.5	8.6	20	4.0	47.2	99.7	27.8
N12	5.0	8.6	20	4.0	48.8	93.5	27.7
N13	0.5	5.4	100	4.0	56.5	96.2	47.3
N14	5.0	5.4	100	4.0	58.0	91.5	44.6
N15	0.5	8.6	100	4.0	60.5	89.2	51.7
N16	5.0	8.6	100	4.0	58.4	85.2	49.7
N17	2.8	7.0	60	2.3	42.4	100.8	42.8
N18	2.8	7.0	60	2.3	42.4	101.4	43.0
N19	2.8	7.0	60	2.3	42.3	101.7	43.1

- 5 El gráfico de contorno para el % de rendimiento de monómero se da en la Figura 16.

Las condiciones óptimas para maximizar el% de monómero eran la concentración de reductor más alta (β -mea 100 mM) y la concentración de desnaturalizante más alta (urea 4 M).

- 10 La concentración de urea tenía un fuerte efecto positivo en el % de monómero. La concentración de β -mea tenía un impacto positivo más débil en el % de monómero. A partir de esta primera selección de intervalos de parámetros, se eligieron intervalos adicionales para una 2ª selección posterior. Estos fueron 80-150 mM para la concentración de β -mea y de 2.5 a 5 M para la concentración de urea. Estos intervalos se eligieron porque eran el límite de la proteína para evitar la formación de una sola cadena.

Ejemplo 5: Selección de parámetros - 2

- 15 Con el fin de encontrar las condiciones óptimas para maximizar el rendimiento de monómero, se realizó una segunda selección de intervalos de parámetros seleccionando intervalos prometedores a partir del Ejemplo 4. Los intervalos elegidos para la segunda selección se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Parámetros para la 2ª selección

Factores	Niveles
Concentración de β -mea	80 - 150 mM
Concentración de urea	2.5 - 5 M
pH	5.4 - 8.6

5 La alimentación era anticuerpo purificado como se proporciona en el Ejemplo 1. Las etapas de conversión se realizaron en una placa de 96 pocillos profundos, se repitió cada experimento y los experimentos se prepararon usando el robot TECAN. El material de alimentación contenía 15% de monómero y el tiempo utilizado para todas las etapas de conversión era de 5 horas. Se añadió primero la urea a la alimentación, seguida rápidamente por el reductor. El experimento se realizó a temperatura ambiente y las muestras se analizaron por SE UPLC después de la filtración. El modelo se ajustó mediante regresiones lineales múltiples.

Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Resultados de la 2ª selección de intervalos de parámetros

Exp. N°	Conc. de urea (M)	pH	Conc. de B-mea (mM)	% rendimiento	% de rendimiento de monómero	% monómero
1	2.5	5.4	80	72.9	29.8	40.9
2	5.0	5.4	80	88.6	68.4	77.2
3	2.5	8.6	80	76.5	33.1	43.3
4	5.0	8.6	80	89.6	68.3	76.3
5	2.5	5.4	150	78.5	35.5	45.2
6	5.0	5.4	150	86.0	69.0	80.3
7	2.5	8.6	150	79.9	38.2	47.8
8	5.0	8.6	150	87.8	70.1	79.9
9	2.5	7.0	115	78.6	36.2	46.1
10	5.0	7.0	115	88.0	69.1	78.6
11	3.8	5.4	115	86.6	52.1	60.2
12	3.8	8.6	115	88.6	55.7	62.9
13	3.8	7.0	80	86.5	52.2	60.3
14	3.8	7.0	150	90.2	60.1	66.6
15	3.8	7.0	115	89.8	57.4	63.9
16	3.8	7.0	115	89.3	57.1	64.0
17	3.8	7.0	115	90.4	58.2	64.4

10 Como en el estudio de selección anterior, la concentración de urea tenía el efecto más fuerte (positivo) en el % de monómero, mientras que la β -mea tenía un efecto mucho menor (positivo) en los intervalos investigados. El cambio de la concentración de β -mea de 80 a 150 mM tenía poco efecto sobre la reacción de conversión.

15 En los experimentos que contenían urea 2.5 M tenían rendimientos bajos, mientras que todos los demás experimentos con concentraciones de urea de 3.8 M y superior tenían todos rendimientos similares significativamente mejorados. El gráfico de contorno para el % de rendimiento de monómero se muestra en la figura 5.

Por tanto, se encontró que cuando se realizaba una conversión de Fab-dsFv tratando el polipéptido expresado de forma recombinante con β -mea de 80 a 150 mM y urea de 3.8 M a 5 M, aumentaba el porcentaje de monómero.

Ejemplo 6: Ensayo de robustez

20 En la Figura 6 se muestra un gráfico de zona óptima a lo largo del espacio experimental para rendimientos de monómeros de 60% y superiores encontrados en el Ejemplo 5.

Se eligieron cinco puntos experimentales en esta área para confirmar los resultados del Ejemplo 5 y para proporcionar un espacio robusto en el que realizar la etapa de conversión. Se demostró que el pH no tiene un efecto significativo en el rendimiento de monómero, por lo que todos los experimentos se realizaron a pH 7.

25 La alimentación era anticuerpo purificado como se proporciona en el Ejemplo 1. La concentración de la alimentación para las muestras era 2.75 g/l y el 15% de esta era monómero. Los puntos experimentales y los resultados del análisis de SE UPLC se muestran en la Tabla 9. La etapa de conversión se ejecutó durante 6 horas.

Tabla 9: Resultados de experimentos para ensayos de robustez

Experimento	Factores			Respuestas		
	Conc. de urea (M)	pH	Conc. de β -mea (mM)	Rendimiento (%)	% de monómero	Rendimiento de monómero (%)
1	4.5	7.0	135	89.8	80.7	72.5
2	4.9	7.0	135	88.1	87.0	76.7
3	4.9	7.0	95	87.4	83.7	73.2
4	4.5	7.0	95	89.1	80.0	71.3
5	4.7	7.0	115	92.9	81.8	75.9

A lo largo de los cinco experimentos, el rendimiento de monómero variaba de 71 a 77%. Las respuestas de rendimiento y % de monómero también fueron bastante consistentes en todos los experimentos.

- 5 Los cromatogramas de SE-UPLC de las muestras antes y después de una etapa de conversión del experimento 5 en la Tabla 9 usando urea 4.7 M y β -mea 115 mM se muestran en la Figura 7 y la Figura 8.

Ejemplo 7: Conversión a escala de 2 L

- 10 La expresión de CHO y la clarificación de A26Fab-645dsFv se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1 para proporcionar líquido de cultivo clarificado como alimentación para el experimento a escala de 2 l. Se realizó un experimento de conversión en un recipiente de fermentación de 2 l, usando un volumen de conversión de 2 l. La concentración de anticuerpo era de 2.2 g/l, de los cuales 30% era monómero. Las condiciones experimentales se muestran en la tabla 10 y la etapa de conversión se llevó a cabo durante 17 h. En el experimento, se añadió primero el reductor β -mea, seguido de urea. Las muestras se analizaron por SE UPLC.

Tabla 10: Condiciones experimentales para el experimento de conversión de 2 L

Conc. de urea (M)	pH	°C	Conc. de β -mea (mM)
3.0	7	Temperatura ambiente	50

15

Tabla 11: Resultados experimentales para el experimento de conversión de 2 L

Carga de fluido de cultivo celular (Etapa previa a la conversión)				Fluido de cultivo celular Posterior a la conversión					
Título (g/l)	Carga de Ab (g)	% de Monómero	Carga de monómero (g)	Título (g/l)	Ab recuperado (g)	Rendimiento de Ab (%)	% de Monómero	Monómero recuperado (g)	Rendimiento de monómero (%)
2.20	4.40	30.2	1.33	1.68	3.36	76.4	78.3	2.63	198.0

- 20 Fue posible aumentar la escala de conversión a escala de 2 L, en recipientes representativos de los utilizados a escala de fabricación. Fue posible aumentar significativamente la cantidad de monómero después de la etapa de conversión con β -mea y urea.

Conclusión:

Se identificaron condiciones robustas para la etapa de conversión, que eran: urea de 4.5 a 4.9 M, β -mea de 95 a 135 mM, 6 horas, concentración de alimentación 2.75 g/l.

Las condiciones más robustas que se identificaron eran: urea 4.7 M, β -mea 115 mM, 6 horas, conc. 2.75 g/l

- 25 Usando estas condiciones más robustas, el % de monómero aumentó sorprendentemente de 15% a 82%. El rendimiento de la etapa de conversión era de 93%, lo que daba como resultado un rendimiento de monómero de 76%. La concentración de monómero en la alimentación era de 0.4 g/l y la concentración de monómero en el producto después de la conversión era de 2.0 g/l. Este es un aumento inesperado de 5 veces en la cantidad de monómero después de la etapa de conversión.
- 30 La etapa de conversión se aumentó de escala con éxito hasta una escala de 2 l utilizando urea 3 M y β -mea 50 mM, utilizando recipientes representativos de aquellos a escala de fabricación.

Listado de secuencias

<110> UCB Biopharma SPRL

<120> Método

<130> PF0019WO

5 <150>
<151>

<160> 38

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1

15 <400> 1
Asn Tyr Gly Ile His
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>
<223> CDRH2

<400> 2
Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

30 <223> CDRH3

<400> 3
Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>
<223> CDRL1

<400> 4
Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala Leu Ala
40 1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
 <223> CDRL2

 <400> 5
 Asn Ala Asn Thr Leu His Thr
 1 5

 5 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 10 <223> CDRL3

 <400> 6
 Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu Thr
 1 5

 <210> 7
 <211> 108
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera del anticuerpo A26

 <400> 7
 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 Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala
 20 25 30

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

 20 Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
 50 55 60

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

 <210> 8
 <211> 117
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada del anticuerpo A26

 <400> 8

ES 2 846 732 T3

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro 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 Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera del componente Fab del anticuerpo anti-OX40

<400> 9

ES 2 846 732 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 Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10

<211> 220

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada del componente Fab del anticuerpo anti-OX40

<400> 10

ES 2 846 732 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro 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 Thr Gly Gly Glu Gly Ile 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
 210 215 220

<210> 11

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada del componente Fv de anti-albúmina

<400> 11

ES 2 846 732 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 Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Cadena ligera del componente Fv de anti-albúmina

<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
20 25 30

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
85 90 95

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

10

15

ES 2 846 732 T3

<220>
 <223> Conector 1

 <400> 13
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

 5 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 10 <223> Conector 2

 <400> 14
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

 <210> 15
 <211> 357
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> A26 Fab Pesada-(G4S, G4T, G4S)-645dsFv(gH5)

 <400> 15
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

ES 2 846 732 T3

Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro 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 Thr Gly Gly Glu Gly Ile 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 Ser Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 225 230 235 240
 Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 245 250 255
 Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp
 260 265 270
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp
 275 280 285

ES 2 846 732 T3

Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr
290 295 300

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
305 310 315 320

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro
325 330 335

Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
340 345 350

Val Thr Val Ser Ser
355

<210> 16

<211> 341

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> A26 Fab Ligera-(3xG4S)-645dsFv(gL4)

<400> 16

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 Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

10

ES 2 846 732 T3

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val
225 230 235 240

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro
245 250 255

Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
260 265 270

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val
275 280 285

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
290 295 300

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly
305 310 315 320

Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val
325 330 335

Glu Ile Lys Arg Thr
340

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Dominio variable de la cadena pesada 645gH1

<400> 17

ES 2 846 732 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 Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Dominio variable de la cadena ligera 645gL1

<400> 18

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
20 25 30

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

10

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
85 90 95

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 19

<211> 355

<212> PRT

15 <213> Artificial

ES 2 846 732 T3

<220>

<223> A26 Fab Pesada-(3xG4S)-645dsFv(gHI)

<400> 19

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro 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 Thr Gly Gly Glu Gly Ile 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

ES 2 846 732 T3

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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
245 250 255

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

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp
275 280 285

Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr
290 295 300

Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr
325 330 335

Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
340 345 350

Val Ser Ser
355

<210> 20

<211> 340

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A26 Fab Ligera-(3xG4S)-645dsFv(gLI)

<400> 20

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

5

10

ES 2 846 732 T3

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Thr	Gln	Ser	Ile	Tyr	Asn	Ala	
			20					25					30			
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
		35					40					45				
Tyr	Asn	Ala	Asn	Thr	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Ala	
	50					55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
65					70					75					80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Leu	
				85					90					95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
			100					105					110			
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
		115					120					125				
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
	130					135					140					
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
145					150					155					160	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
				165					170					175		
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
			180					185					190			
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
		195					200					205				
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
	210					215					220					
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	
225					230					235					240	
Val	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Gln	Ser	Ser	
				245					250					255		
Pro	Ser	Val	Trp	Ser	Asn	Phe	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	
			260					265					270			

ES 2 846 732 T3

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly
275 280 285

Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
290 295 300

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly
305 310 315 320

Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
325 330 335

Val Glu Ile Lys
340

<210> 21

<211> 1137

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de A26-645(gH5) que incluye líder OmpA de E. coli

<400> 21

atgaagaaga	ctgctatagc	gatcgagtg	gcgctagctg	gtttcgccac	cgtggcgcaa	60
gctgaagttc	agctgggtcga	gtctggaggc	gggcttgctc	agcctggagg	gagcctgcgt	120
ctctcttggt	cagcaagcgg	tttcacgttc	accaaactacg	gtatccactg	gattcgtcag	180
gcaccaggta	aaggtctgga	atgggtagcc	tctatctctc	cgtctgggtg	tctgacgtac	240
taccgtgact	ctgtcaaagg	tcgtttcacc	atctctcgtg	atgacgcgaa	aaactctccg	300
tacctgcaaa	tgaactctct	gcgtgcagaa	gataccgcag	tgtactactg	cgctactggt	360
ggtgaaggta	tcttcgacta	ctgggggtcag	ggtaccctgg	taactgtctc	gagcgcttct	420
acaaagggcc	caagcggtttt	cccactggct	ccgtcctcta	aatccacctc	tggtggtacg	480
gctgcactgg	gttgccctggt	gaaagactac	ttcccagaac	cagttaccgt	gtcttggaac	540
tctggtgcac	tgacctctgg	tggtcacacc	tttccagcag	ttctccagtc	ttctggtctg	600
tactccctgt	ctagcgtggt	taccgttccg	tcttcttctc	tgggtactca	gacctacatc	660
tgcaacgtca	accacaaacc	gtccaacacc	aaggtcgaca	aaaaagtcga	gccgaaatcc	720
tgtagtggag	gtggggggctc	aggtggaggc	gggaccggtg	gaggtggcag	cgaggttcaa	780
ctgcttgagt	ctggaggagg	cctagtccag	cctggaggga	gcctgcgtct	ctcttggtgca	840
gtaagcggca	tcgacctgag	caattacgcc	atcaactggg	tgagacaagc	tccggggaag	900
tgtttagaat	ggatcggtat	aatatgggcc	agtgggacga	ccttttatgc	tacatgggcg	960
aaaggaaggt	ttacaattag	ccgggacaat	agcaaaaaca	ccgtgtatct	ccaaatgaac	1020
tccttgcgag	cagaggacac	ggcgggtgtac	tattgtgctc	gcactgtccc	aggttatagc	1080
actgcaccct	acttcgatct	gtggggacaa	gggaccctgg	tgactgtttc	aagttaa	1137

<210> 22

<211> 1074

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 846 732 T3

<220>

<223> Cadena pesada de A26-645(gH5)

<400> 22

gaagttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc	60
tcttgtgcag caagcgggtt caggttcacc aactacggtg tccactggat tcgtcaggca	120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggtct gacgtactac	180
cgtgactctg tcaaaggctg tttcaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac	240
ctgcaaatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactggtggt	300
gaaggtatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag cgcttctaca	360
aagggcccaa gcgttttccc actggctccg tcctctaaat ccacctctgg tggtagcgct	420
gcactgggtt gcctggtgaa agactacttc ccagaaccag ttaccgtgtc ttggaactct	480
ggtgcactga cctctggtgt tcacaccttt ccagcagttc tccagtcttc tggctctgtac	540
tccctgtcta gcgtggttac cgttccgtct tcttctctgg gtactcagac ctacatctgc	600
aacgtcaacc acaaaccgct caacaccaag gtcgacaaaa aagtcgagcc gaaatcctgt	660
agtggagggtg ggggctcagg tggaggcggg accggtggag gtggcagcga ggttcaactg	720
cttgagtctg gaggaggcct agtccagcct ggaggagcc tgcgtctctc ttgtgcagta	780
agcggcatcg acctgagcaa ttacgccatc aactgggtga gacaagctcc ggggaagtgt	840
ttagaatgga tcggtataat atgggccagt gggacgacct tttatgctac atgggcgaaa	900
ggaaggttta caattagccg ggacaatagc aaaaacaccg tgtatctcca aatgaactcc	960
ttgcgagcag aggacacggc ggtgtactat tgtgctcgca ctgtcccagg ttatagcact	1020
gcaccctact tcgatctgtg gggacaaggg accctgggtga ctgtttcaag ttaa	1074

5

<210> 23

<211> 1089

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cadena ligera de A26-645(gL4) que incluye líder OmpA de E. coli

<400> 23

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gcgttggtg gtttcgagc cgttgcgcaa	60
---	----

ES 2 846 732 T3

gctgatatcc agatgaccca gagcccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
 actattacct gtcgtgcaac ccagagcatc tacaacgctc tggcttggtg tcagcagaaa 180
 ccgggtaaag cgccaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac tgggtgtccg 240
 tctcgtttct ctgcgtctgg ttctggtagc gactctactc tgaccatctc ctctctccag 300
 ccggaagatt tcgcgaccta ctactgccag cagtactacg attaccact gacgtttggt 360
 ggtggtacca aagttgagat caaacgtacg gttgcagctc catccgtctt catctttcca 420
 ccgtctgacg aacagctcaa atctggtagt gcttctgtcg tttgcctcct gaacaacttc 480
 tatccgcgtg aagcgaaagt ccagtggaaa gtcgacaacg cactccagtc tggtaactct 540
 caggaatctg tgaccgaaca ggactccaaa gactccacct actctctgtc tagcaccctg 600
 actctgtcca aagcagacta cgagaaacac aaagtgtacg cttgcgaagt taccatcag 660
 ggtctgagct ctccggttac caaatccttt aatagagggg agtgtggtgg cgggtgcagt 720
 ggtggtggag gttccggagg tggcgggtca gacatacaaa tgaccagag tccttcatcg 780
 gtatccgcgt ccgttggcga tagggtgact attacatgtc aaagctctcc tagcgtctgg 840
 agcaattttc tatcctggta tcaacagaaa ccggggaagg ctccaaaact tctgatttat 900
 gaagcctcga aactcaccag tggagttccg tcaagattca gtggctctgg atcagggaca 960
 gacttcacgt tgacaatcag ttcgctgcaa ccagaggact ttgcgaccta ctattgtggt 1020
 ggaggttaca gtagcataag tgatacgaca tttgggtgcg gtactaaggt ggaaatcaaa 1080
 cgtacctaa 1089

<210> 24
 <211> 1026
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera de A26-645(gL4)

<400> 24
 gatatccaga tgaccagag cccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
 attacctgtc gtgcaacca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg 120
 ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcatactgg tgttccgtct 180
 cgtttctctg cgtctggttc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctccagccg 240
 gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttggtggt 300
 ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacggtt gcagctccat ccgtcttcat ctttccaccg 360
 tctgacgaac agctcaaactc tggtagtctt tctgtcgttt gcctcctgaa caacttctat 420
 ccgctggaag cgaaagtcca gtggaaagtc gacaacgcac tccagtctgg taactctcag 480
 gaatctgtga ccgaacagga ctccaaagac tccacctact ctctgtctag caccctgact 540

ES 2 846 732 T3

ctgtccaaag cagactacga gaaacacaaa gtgtacgctt gcgaagttac ccatcagggt 600
ctgagctctc cggttaccaa atcctttaat agaggggagt gtggtggcgg tggcagtgg 660
ggtggagggt ccggagggtg cggttcagac atacaaatga cccagagtcc ttcacgcgta 720
tccgcgtccg ttggcgatag ggtgactatt acatgtcaaa gctctcctag cgtctggagc 780
aattttctat cctggtatca acagaaaccg gggaaggctc caaaacttct gatttatgaa 840
gcctcgaaac tcaccagtgg agttccgtca agattcagtg gctctggatc agggacagac 900
ttcacgttga caatcagttc gctgcaacca gaggactttg cgacctacta ttgtggtgga 960
ggttacagta gcataagtga tacgacatth gggtgcggta ctaagggtga aatcaaaccg 1020
acctaa 1026

<210> 25
<211> 1131
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Cadena pesada de A26-645(gH5) que incluye secuencia líder B72.3

<400> 25
atggaatggc cctgggtcct cctgtttttc ctttctgtca caaccggggg gcacagcgag 60
gtgcagctcg tcgagtctgg aggcgggctt gtccagcctg gaggagagcct gcgtctctct 120
tgtgcagcaa gcggtttcac gttcaccaac tacggtatcc actggattcg tcaggcacca 180
ggtaaagggt tggaaagggt agcctctatc tctccgtctg gtggtctgac gtactaccgt 240
gactctgtca aagggtcgtt caccatctct cgtgatgacg cgaaaaactc tccgtacctg 300
cagatgaact ctctgcgtgc agaagatacc gcagtgtact actgcgctac tgggtggtgaa 360
ggtatcttcg actactgggg tcagggtacc ctggtaactg tctcaagcgc ttctacaaag 420
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcgcc 480
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc 540
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctctgg actctactcc 600
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac 660
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag ttgagcccaa atcttgttcc 720
ggagggtggc gttccggagg tggcgggtacc ggtggcgggt gatccgaagt ccagctgctt 780
gaatccggag gcggactcgt gcagcccga ggcagtcttc gcttgcctg cgctgtatct 840
ggaatcgacc tgagcaatta cgccatcaac tgggtgagac aggcacctgg gaaatgcctc 900
gaatggatcg gcattatatg ggctagtggg acgacctttt atgctacatg gggaagggt 960
agattcacia tctcacggga taatagtaag aacacagtgt acctgcagat gaactccctg 1020
cgagcagagg ataccgccgt ttactattgt gctcgcactg tcccagggtta tagcactgca 1080
ccctactttg atctgtgggg gcagggcact ctggtcaccg tctcgagttg a 1131

<210> 26
<211> 1074
<212> ADN
<213> Artificial

15

<220>

ES 2 846 732 T3

<223> Cadena pesada de A26-645(gH5)

<400> 26

gaggtgcagc	tcgtcgagtc	tggaggcggg	cttgtccagc	ctggagggag	cctgcgtctc	60
tcttgtgcag	caagcgggtt	cacgttcacc	aactacggta	tccactggat	tcgtcaggca	120
ccaggtaaag	gtctggaatg	ggtagcctct	atctctccgt	ctggtggtct	gacgtactac	180
cgtgactctg	tcaaaggctg	tttcaccatc	tctcgtgatg	acgcgaaaaa	ctctccgtac	240
ctgcagatga	actctctgcg	tgcagaagat	accgcagtgt	actactgcgc	tactggtggt	300
gaaggtatct	tcgactactg	gggtcagggt	accctggtaa	ctgtctcaag	cgcttctaca	360
aagggcccat	cggtcttccc	cctggcacc	tcctccaaga	gcacctctgg	gggcacagcg	420
gccctgggct	gcctggtcaa	ggactacttc	cccgaaccgg	tgacggtgtc	gtggaactca	480
ggcgccctga	ccagcggcgt	gcacaccttc	ccggctgtcc	tacagtcctc	tggactctac	540
tccctcagca	gcgtggtgac	cgtgccctcc	agcagcttgg	gcaccagac	ctacatctgc	600
aacgtgaatc	acaagcccag	caacaccaag	gtggacaaga	aagttgagcc	caaactctgt	660
tccggagggtg	gcggttccgg	aggtggcggg	accggtggcg	gtggatccga	agtccagctg	720
cttgaatccg	gaggcggact	cgtgcagccc	ggaggcagtc	ttcgcttgtc	ctgcgctgta	780
tctggaatcg	acctgagcaa	ttacgccatc	aactgggtga	gacaggcacc	tgggaaatgc	840
ctcgaatgga	tcggcattat	atgggctagt	gggacgacct	tttatgctac	atgggcgaag	900
ggtagattca	caatctcacg	ggataatagt	aagaacacag	tgtacctgca	gatgaactcc	960
ctgcgagcag	aggataccgc	cgtttactat	tgtgctcgca	ctgtcccagg	ttatagcact	1020
gcaccctact	ttgatctgtg	ggggcagggc	actctggtca	ccgtctcgag	ttga	1074

<210> 27

<211> 1086

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de A26-645(gL4) que incluye secuencia líder B72.3

<400> 27

atgtcagttc	ccacacaggt	gctgggcctg	cttctgttgt	ggctcaccga	tgctaggtgt	60
gatatccaga	tgaccagag	tccaagcagt	ctctccgcca	gcgtaggcga	tcgtgtgact	120

ES 2 846 732 T3

attacctgtc gtgcaaccca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg 180
 ggtaaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataaccg tgttccgtct 240
 cgtttctctg cgtctggttc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctgcagccg 300
 gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttggtggt 360
 ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccccca 420
 tctgatgagc agttgaagtc tggcactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctac 480
 cctagagagg ccaaagtcca gtggaaggtg gataacgccc ttcaatccg aaactcccag 540
 gagagtgtca ctgagcagga ctcaaaggac tccacctata gccttagcag cacactgaca 600
 ctgagcaagg ctgactacga gaaacacaag gtctacgcct gcgaagtgac acatcaaggc 660
 ctgagctcac ccgtgacaaa gagctttaac aggggagagt gtggtggagg tggctctggc 720
 ggtggtggct ccggaggcgg aggaagcgac atccagatga ccagagccc ttcctctgta 780
 agcgccagtg tcggagacag agtgactatt acctgccaaa gctccccttc agtctggtcc 840
 aattttctat cctggtacca gcaaagccc ggaaaggctc cttaaattgct gatctacgaa 900
 gcaagcaaac tcaccagcgg cgtgcccgac aggttcagcg gcagtgggtc tggaactgac 960
 tttaccctga caatctcctc actccagccc gaggacttcg ccacctatta ctgcggtgga 1020
 ggttacagta gcataagtga tacgacattt ggatgcggca ctaaagtgga aatcaagcgt 1080
 acctga 1086

<210> 28

<211> 1026

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Cadena ligera de A26-645(gL4)

<400> 28

gatatccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
 attacctgtc gtgcaaccca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg 120
 ggtaaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataaccg tgttccgtct 180
 cgtttctctg cgtctggttc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctgcagccg 240
 gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttggtggt 300
 ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccccca 360
 tctgatgagc agttgaagtc tggcactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctac 420
 cctagagagg ccaaagtcca gtggaaggtg gataacgccc ttcaatccg aaactcccag 480
 gagagtgtca ctgagcagga ctcaaaggac tccacctata gccttagcag cacactgaca 540

10

ES 2 846 732 T3

ctgagcaagg ctgactacga gaaacacaag gtctacgcct gcgaagtgac acatcaaggc 600
ctgagctcac ccgtgacaaa gagctttaac aggggagagt gtggtggagg tggctctggc 660
ggtggtggct ccggaggcgg aggaagcgac atccagatga cccagagccc ttcctctgta 720
agcgccagtg tcggagacag agtgactatt acctgccaaa gctccccttc agtctggtcc 780
aattttctat cctggtacca gcaaaagccc ggaaaggctc ctaaattgct gatctacgaa 840
gcaagcaaac tcaccagcgg cgtgcccagc aggttcagcg gcagtgggtc tggaactgac 900
tttaccctga caatctcctc actccagccc gaggacttcg ccacctatta ctgcggtgga 960
ggttacagta gcataagtga tacgacattt ggatgcggca ctaaagtgga aatcaagcgt 1020
acctga 1026

<210> 29
<211> 121
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-albúmina (no ds)

<400> 1
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 30
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
15 <223> Dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-albúmina (ds)

<400> 2

ES 2 846 732 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 Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 31

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-albúmina (no ds)

<400> 3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
20 25 30

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

10 Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
85 90 95

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-albúmina (ds)

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
20 25 30

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
85 90 95

5 Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Conector 1

<400> 5

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 34

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Conector 2

20 <400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 35

<211> 789

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> 645 gH5gL4

<400> 13

ES 2 846 732 T3

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc	60
tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc aactacgcga ttaactgggt acgtcaggca	120
ccgggtaaag gtctggaatg gatcggcatc atctgggcct ctggtacgac cttctacgct	180
acttgggcca aaggtcgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg	240
cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg taccgttccg	300
ggctattcta ctgcaccgta cttcgacctg tggggtcagg gtactctggt taccgtctcg	360
agtggaggtg gcggttctgg cggtaggcgt tccggtggcg gtggatcggg aggtggcggg	420
tctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtgtttccg ccagcgtagg cgatcgtgtg	480
actattacct gtcagtcctc tccgagcgtt tgggtccaact tcctgagctg gtaccagcag	540
aaaccgggta aagccccgaa actgctgac tacgaggcgt ctaaactgac ctctggtgta	600
ccgtcccgtt tctctggctc tggctctggt acggacttca ctctgaccat ctctctctcg	660
cagccggaag actttgcaac gtactactgc ggtggtggtt actcttccat ctctgacacc	720
acgttcgggtg gaggcaccaa agttgaaatc aaacgtacgc atcaccatca ccatcaccat	780
caccatcac	789

<210> 36

<211> 263

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> 645 gH5gL4

<400> 14

ES 2 846 732 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 Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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
 Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
 130 135 140
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 145 150 155 160
 Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 165 170 175
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu
 180 185 190
 Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 210 215 220
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr
 225 230 235 240
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr His His His
 245 250 255
 His His His His His His His
 260

<210> 37

<211> 789

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 846 732 T3

<223> 645 gH5gL4ds

<400> 15

gaggttcagc	tgctggagtc	tgaggcggg	cttgtccagc	ctggaggag	cctgcgtctc	60
tcttgtgcag	taagcgccat	cgacctgtcc	aactacgca	ttaactgggt	acgtcaggca	120
ccgggtaaat	gcctggaatg	gatcggcatc	atctgggcct	ctggtacgac	cttctacgct	180
acttgggcca	aaggtcgttt	caccatctcc	cgtgacaact	ctaaaaacac	cgtgtacctg	240
cagatgaact	ctctgcgtgc	ggaagacact	gcggtttact	attgcgcgcg	taccgttccg	300
ggctattcta	ctgcaccgta	cttcgacctg	tggggtcagg	gtactctggt	taccgtctcg	360
agtggaggtg	gcggttctgg	cggtggcggt	tccggtggcg	gtggatcggg	aggtggcggg	420
tctgatatcc	agatgaccca	gagtccaagc	agtgtttccg	ccagcgtagg	cgatcgtgtg	480
actattacct	gtcagtcctc	tccgagcggt	tgggtccaact	tcctgagctg	gtaccagcag	540
aaaccgggta	aagccccgaa	actgctgata	tacgaggcgt	ctaaactgac	ctctggtgta	600
ccgtcccgtt	tctctggctc	tggctctggt	acggacttca	ctctgaccat	ctcctctctg	660
cagccggaag	actttgcaac	gtactactgc	ggtggtgggt	actcttccat	ctctgacacc	720
acgttcgggt	gtggcaccaa	agttgaaatc	aaacgtacgc	atcaccatca	ccatcaccat	780
caccatcac						789

<210> 38

<211> 263

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 645 gH5gL4ds

<400> 16

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		

ES 2 846 732 T3

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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
 Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
 130 135 140
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 145 150 155 160
 Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 165 170 175
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu
 180 185 190
 Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 210 215 220
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr
 225 230 235 240
 Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr His His His
 245 250 255
 His His His His His His His
 260

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar el porcentaje de monómero en una composición de moléculas de anticuerpos expresadas de manera recombinante, caracterizado por que la molécula de anticuerpo comprende al menos un Fv con especificidad por un antígeno de interés que comprende un VH y un VL en donde dichos VH y VL están conectados directa o indirectamente mediante uno o más conectores y están estabilizados por un enlace disulfuro entre ellos, dicho método comprende:
 - a) una etapa de conversión de tratamiento de la composición con un desnaturizante seleccionado del grupo que consiste en urea e hidrocloreuro de guanidina, en donde la urea está en una concentración de 1 a 5 molar o el hidrocloreuro de guanidina está en una concentración de 1 a 2 molar;
 - b) en donde la etapa a) se realiza en presencia de un agente reductor o después del tratamiento con un agente reductor, en donde el agente reductor es un agente reductor tiol que comprende un solo grupo tiol, y en donde el agente reductor está en una concentración de 10 a 150 milimolar.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde el agente reductor tiol que comprende un solo grupo tiol está en una concentración de 50 a 150 milimolar.
3. Un método según la reivindicación 2, en donde el agente reductor tiol que comprende un solo grupo tiol está en una concentración de 95 a 135 milimolar, por ejemplo, de 110 a 120 milimolar.
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente reductor tiol que comprende un solo grupo tiol es 2-mercaptoetilamina.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la urea está en una concentración de 3 a 5 molar.
6. Un método según la reivindicación 5, en donde la urea está en una concentración de 4.5 a 4.9 molar, por ejemplo 4.7 molar.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la etapa a) se lleva a cabo durante un período en el intervalo de 2 a 70 horas, por ejemplo, de 3 a 50 horas, tal como de 4 a 25 horas, en particular de 4 a 6 horas, por ejemplo 6 horas.
8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el método se realiza a temperatura ambiente.
9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo está en una concentración en el intervalo de 0.5 g/l a 5 g/l.
10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la etapa de conversión se realiza en presencia de agitación concomitante.
11. Un método según la reivindicación 10, en donde la velocidad de agitación está en el intervalo de 100 a 1200 rpm.
12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende una etapa adicional de purificación subsiguiente.
13. Un método según la reivindicación 12, en donde el procesamiento subsiguiente comprende la etapa de cromatografía.
14. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el VH y VL que están conectados directa o indirectamente a través de uno o más conectores y están estabilizados por un enlace disulfuro entre ellos, son una pareja VH/VL complementaria que forma un sitio de unión al antígeno.
15. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el VH y VL están conectados directamente a través de un conector.
16. Método según la reivindicación 15, en donde el anticuerpo se selecciona de un dsscFv, un Fab-2xdsscFv, un Fab-dsscFv-dsFv, un Fab-dsscFv-sdAb, un Fab-dsscFv-scFv y un Fab-dsscFv.
17. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde cada VH y VL comprende un conector que conecta indirectamente el VH y VL a través un segundo anticuerpo.
18. Un método según la reivindicación 17, en donde el anticuerpo es un Fab-dsFv.
19. Un método según la reivindicación 18, en donde el anticuerpo es una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico que se une a OX40 humano y a seroalbúmina humana que comprende:

una cadena pesada que comprende, en secuencia desde el extremo N, un primer dominio variable de la cadena pesada (V_{H1}), un dominio C_{H1} y un segundo dominio variable de la cadena pesada (V_{H2}),

una cadena ligera que comprende, en secuencia desde el extremo N, un primer dominio variable de la cadena ligera (V_{L1}), un dominio C_L y un segundo dominio variable de la cadena ligera (V_{L2}),

- 5 en donde dichas cadenas pesadas y ligeras están alineadas de manera que V_{H1} y V_{L1} forman un primer sitio de unión al antígeno y V_{H2} y V_{L2} forman un segundo sitio de unión al antígeno,

en donde el antígeno unido por el primer sitio de unión al antígeno es OX40 humano y el antígeno unido por el segundo sitio de unión al antígeno es seroalbúmina humana.

- 10 20. Un método según la reivindicación 19, en donde el primer dominio variable de la cadena pesada (V_{H1}) comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3 y el primer dominio variable de la cadena ligera (V_{L1}) comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3,

- 15 en donde el segundo dominio variable de la cadena pesada (V_{H2}) tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11 y el segundo dominio variable de la cadena ligera (V_{L2}) tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 12 y

el segundo dominio variable de la cadena pesada (V_{H2}) y segundo dominio variable de la cadena ligera (V_{L2}) están unidos por un enlace disulfuro.

- 20 21. Una composición que comprende un agente reductor tiol que comprende un solo grupo tiol y un desnaturizante seleccionado de urea e hidrocloreuro de guanidina para convertir especies multiméricas de una molécula de anticuerpo en monómeros en donde la molécula de anticuerpo comprende al menos un Fv con especificidad por un antígeno de interés que comprende un V_H y un V_L en donde dichos V_H y V_L están conectados directa o indirectamente a través de uno o más conectores y están estabilizados por un enlace disulfuro entre ellos, en donde el agente reductor tiol que comprende un solo grupo tiol está en una concentración de 10 a 150 milimolar, la urea está en una concentración de 1 a 5 molar o el hidrocloreuro de guanidina está en una concentración de 1 a 2 molar.

- 25 22. Una composición según la reivindicación 21, en donde el agente reductor tiol que comprende un solo grupo tiol es 2-mercaptoetilamina.

23. Una composición según la reivindicación 22, en la que la urea es de 3 a 5 molar y la 2-mercaptoetilamina es de 80 a 150 milimolar.

- 30 24. Uso de una composición que comprende un agente reductor tiol que comprende un solo grupo tiol y un desnaturizante seleccionado de urea e hidrocloreuro de guanidina para convertir especies multiméricas de una molécula de anticuerpo en monómeros, en donde la molécula de anticuerpo comprende al menos un Fv con especificidad por un antígeno de interés, que comprende un V_H y un V_L en donde dichos V_H y V_L están conectados directa o indirectamente a través de uno o más conectores y están estabilizados por un enlace disulfuro entre ellos, en donde el agente reductor tiol que comprende un solo grupo tiol está en una concentración de 10 a 150 milimolar, la urea está en una concentración de 1 a 5 molar o el hidrocloreuro de guanidina está en una concentración de 1 a 2 molar.

35 25. Uso de una composición según la reivindicación 24, en donde el agente reductor tiol que comprende un solo grupo tiol es 2-mercaptoetilamina.

Figura 1

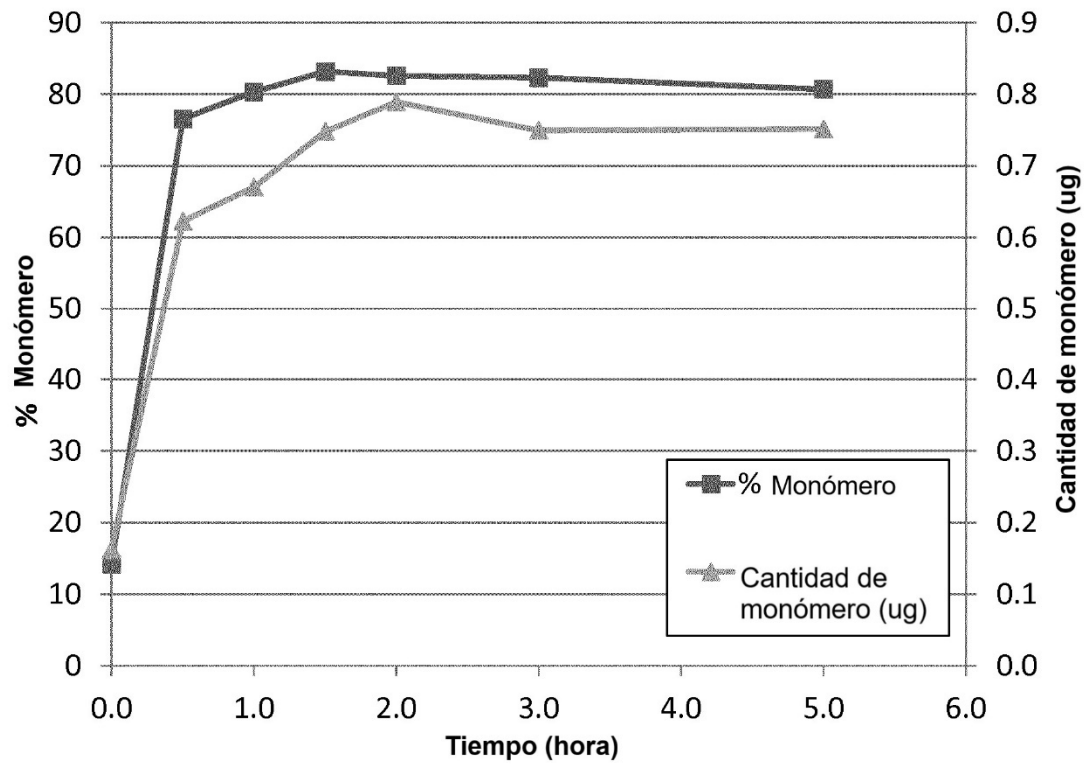


Figura 2A

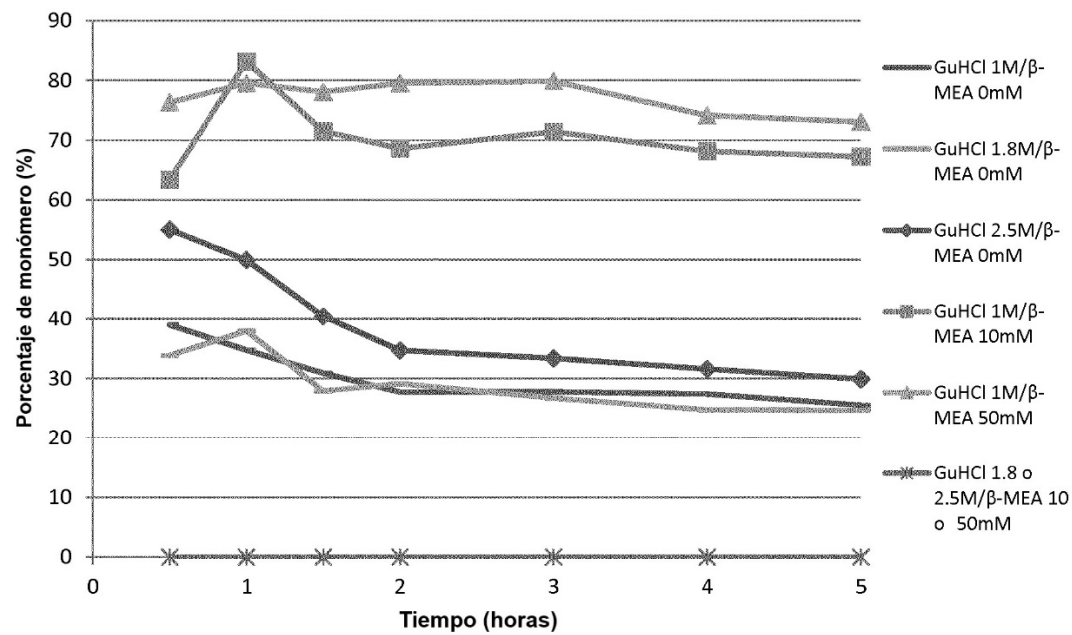


Figura 2B:

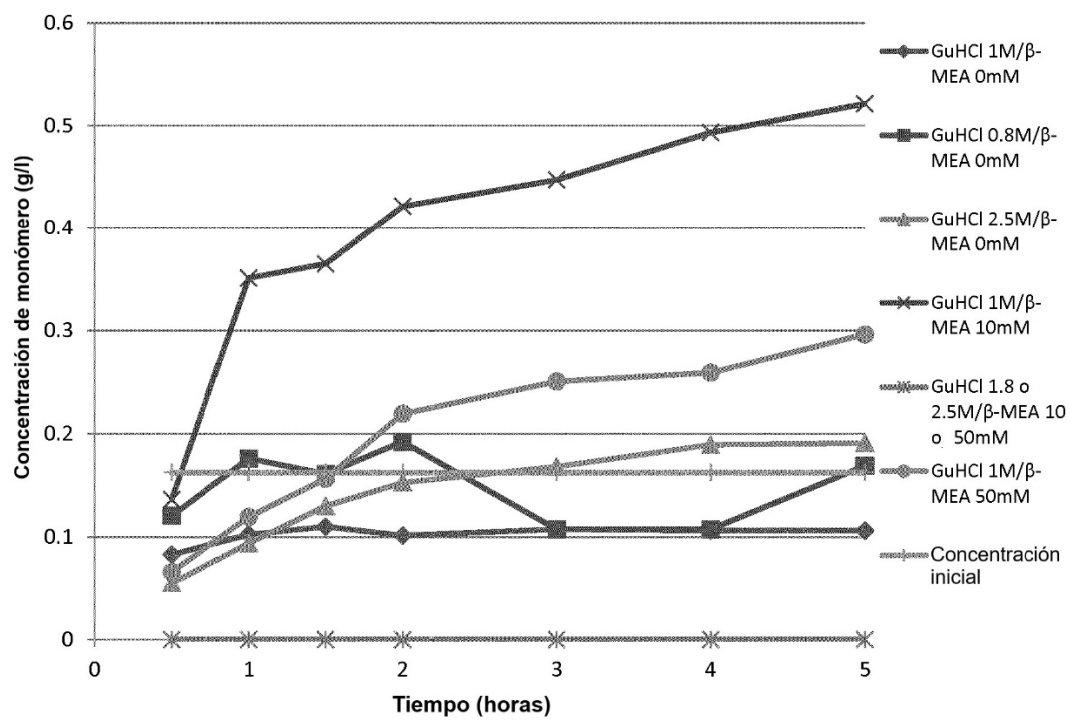


Figura 2C:

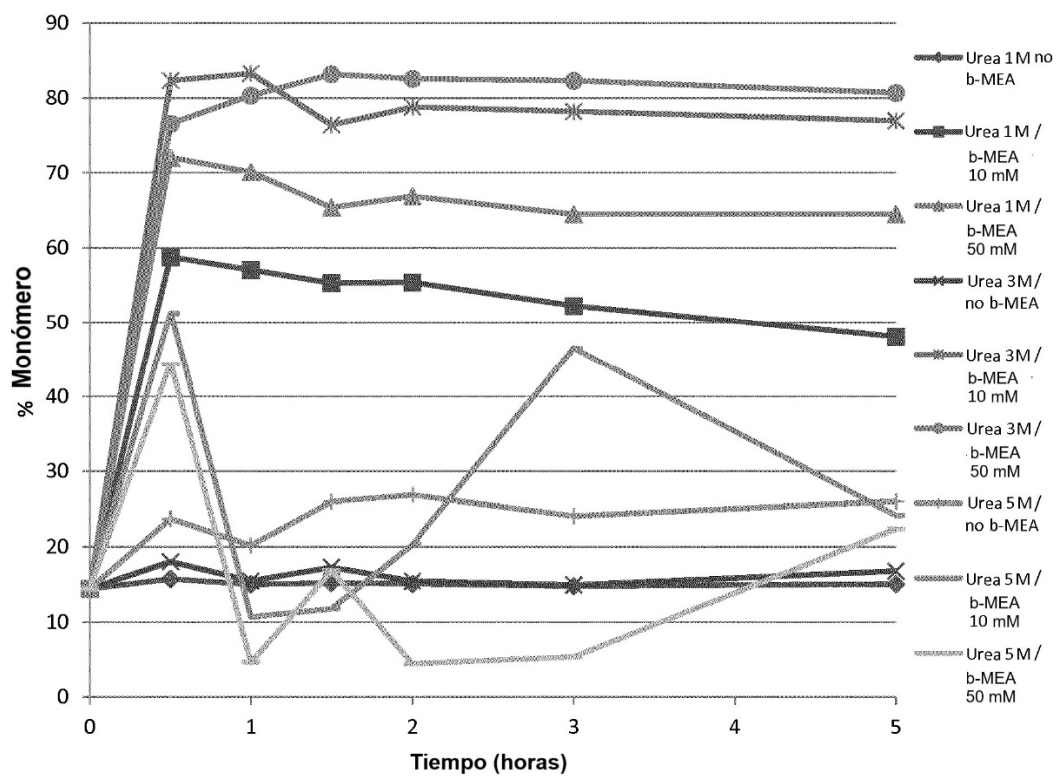


Figura 2D:

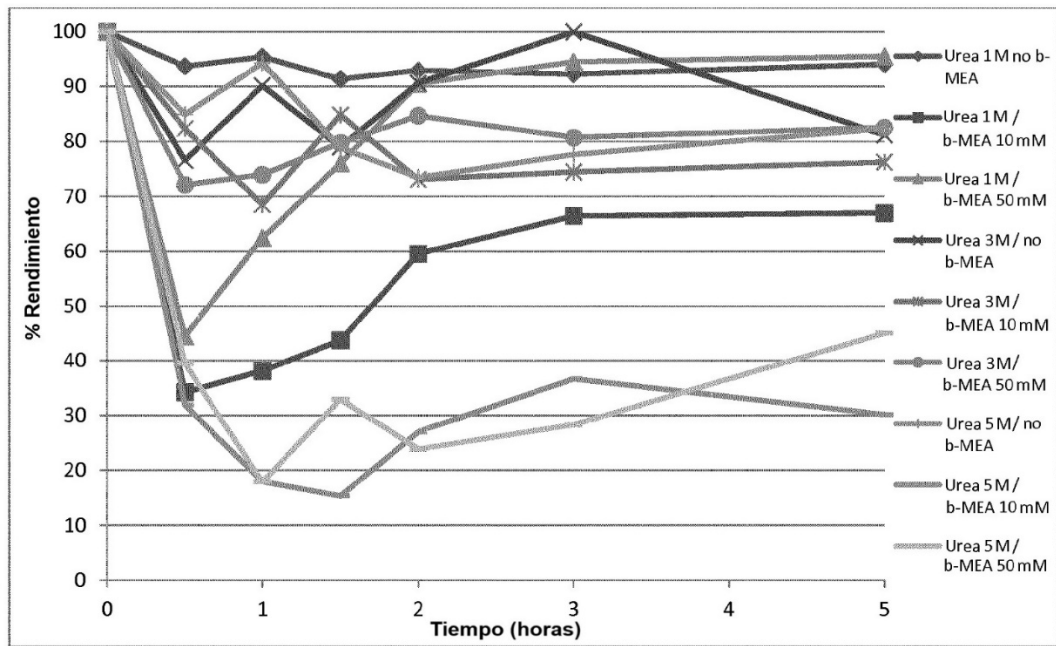


Figura 2E:

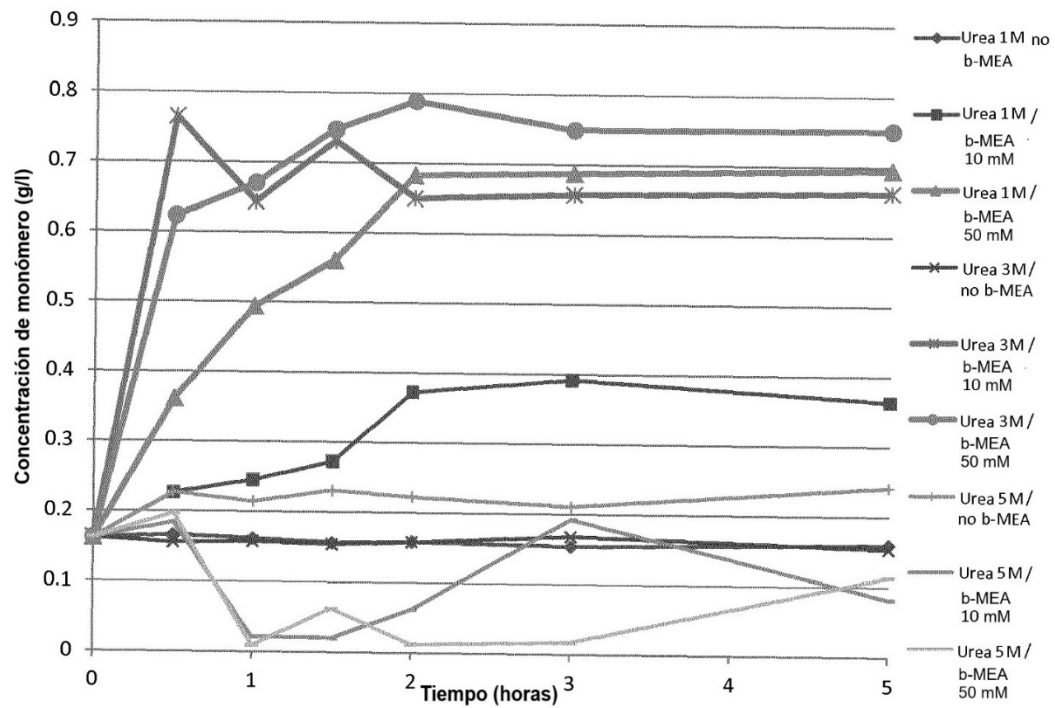


Figura 3:

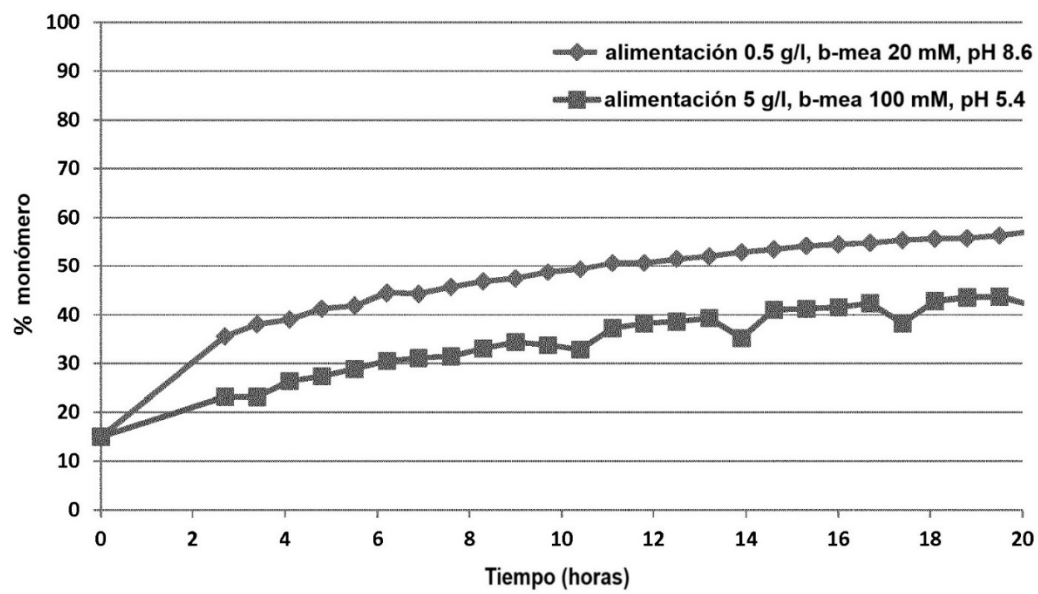


Figura 4

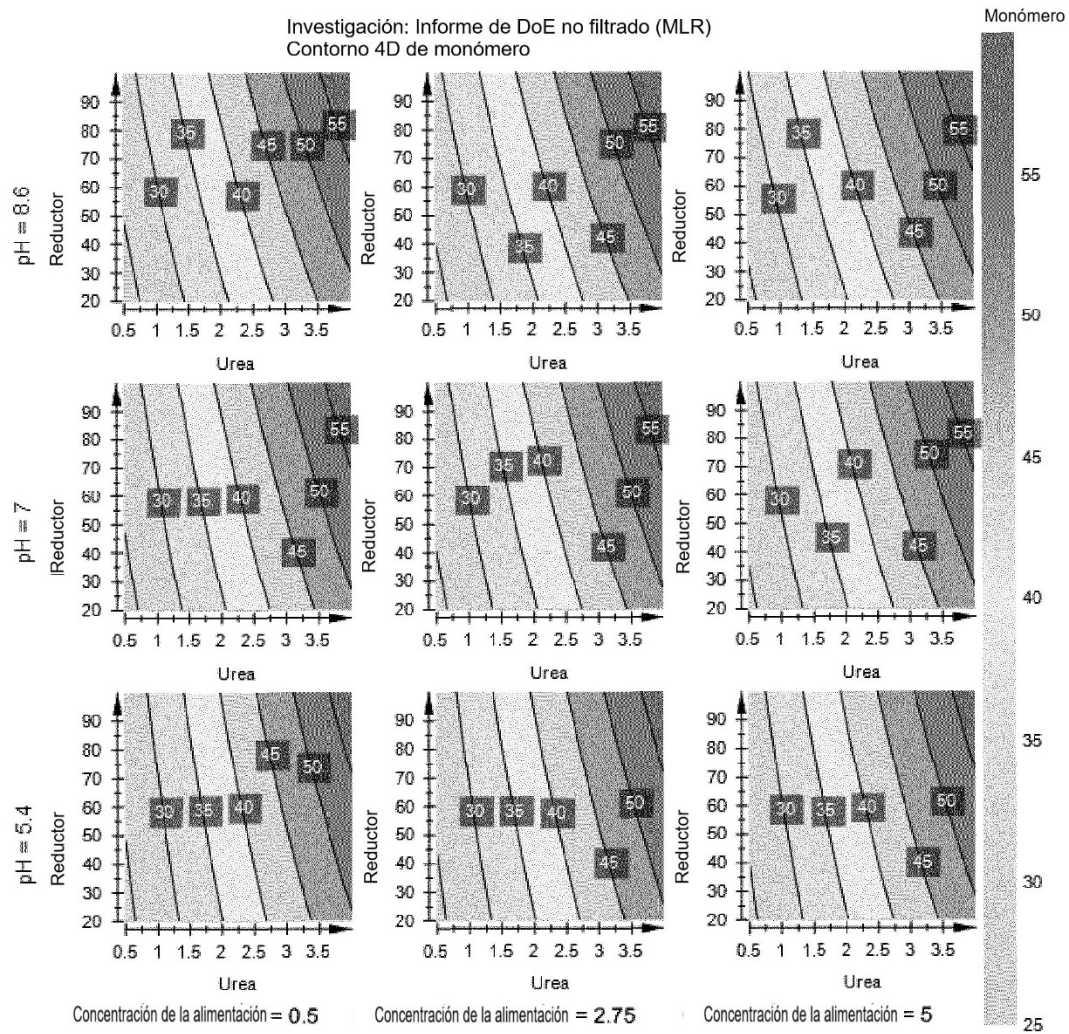


Figura 5

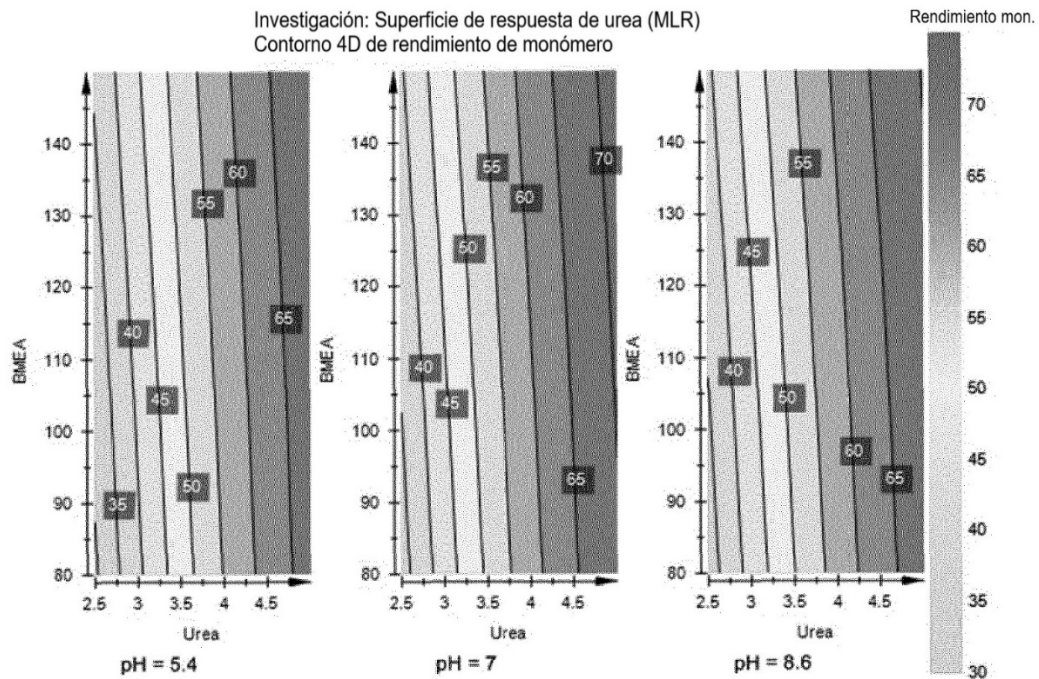


Figura 6

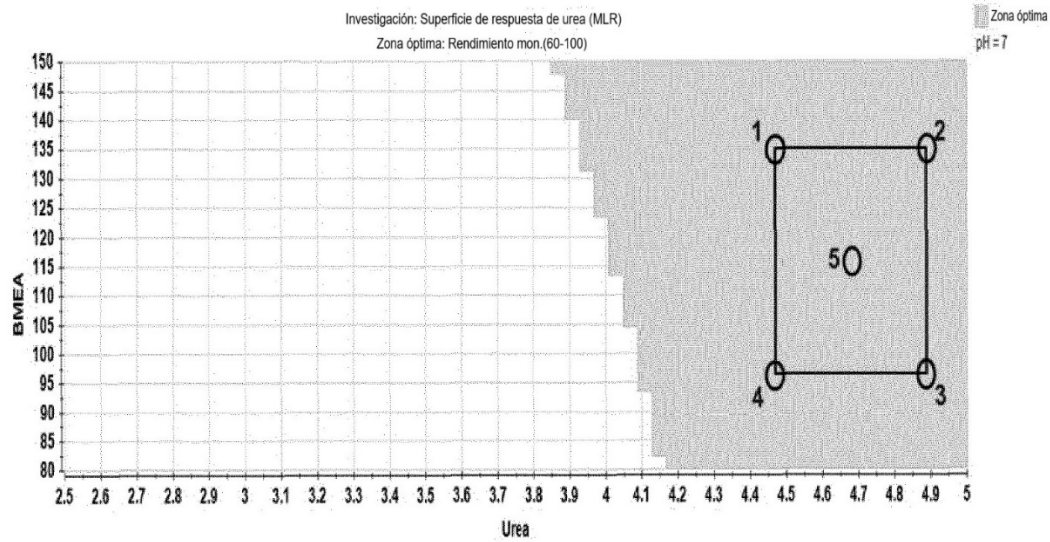


Figura 7

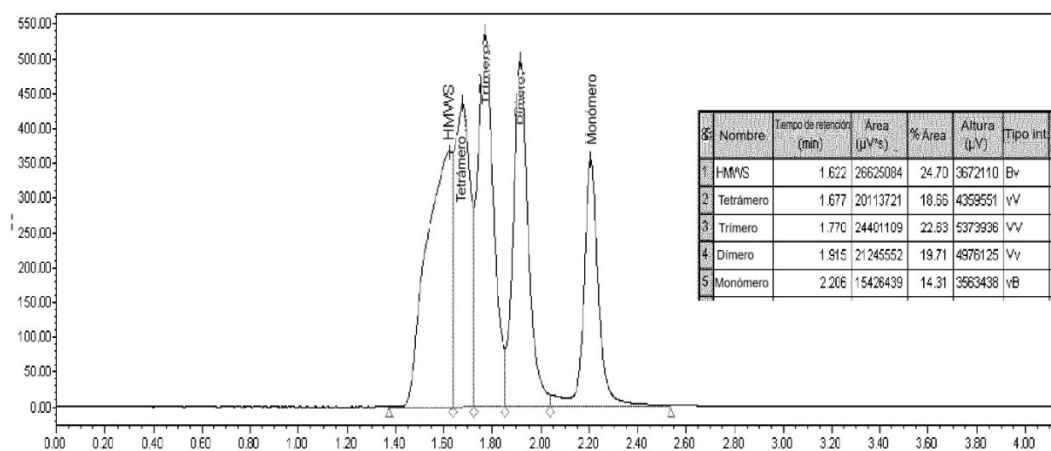


Figura 8:

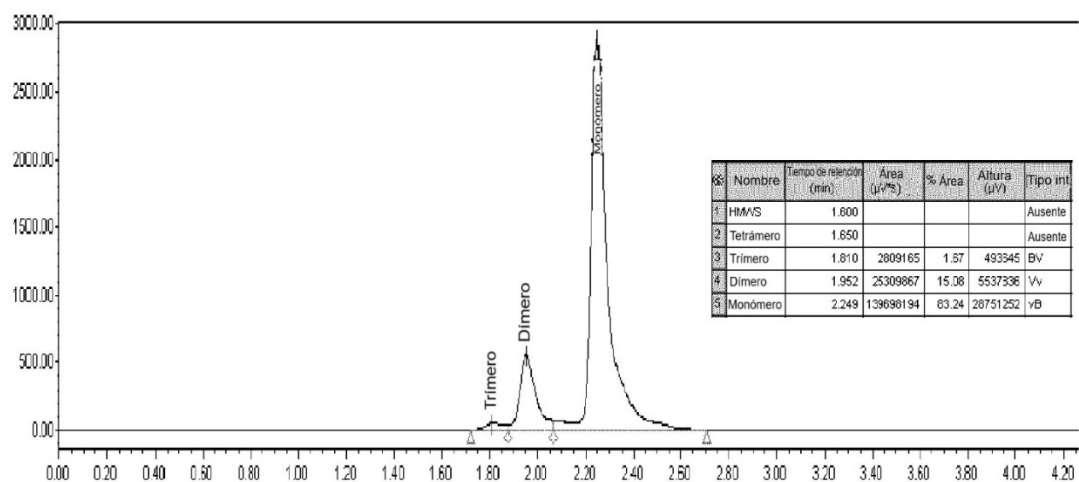
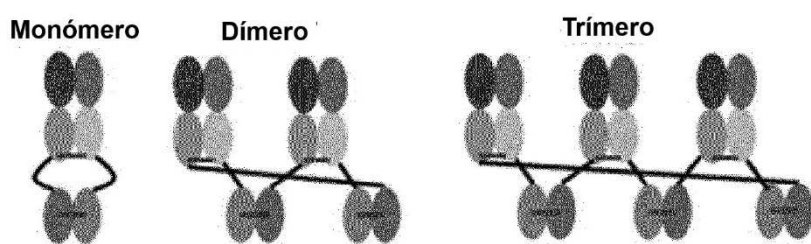


FIGURA 9



Fab = Cadena pesada y ligera de Fab con un enlace disulfuro entre la cadena pesada y ligera y conectores unidos al extremo C de la región constante de la cadena pesada y la cadena ligera para unirse al dsFv



dsFv = Fv estabilizado por disulfuro y conectores para unirse al Fab

Figura 10

(a) Región variable de la cadena ligera del anticuerpo A26 específico para OX40 (SEQ ID NO: 7)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPS
 RFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGGTKVEIKR

(b) Región variable de la cadena pesada del anticuerpo A26 específico para OX40 (SEQ ID NO: 8)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTY
 YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLVTVSS

(c)

CDRH1:	NYGIH (SEQ ID NO:1)
CDRH2:	SISPSGGLTYRDSVKG (SEQ ID NO:2)
CDRH3:	GGEGIFDY (SEQ ID NO:3)
CDRL1:	RATQSIYNALA (SEQ ID NO:4)
CDRL2:	NANTLHT (SEQ ID NO:5)
CDRL3:	QQYYDYPLT (SEQ ID NO:6)

(d) Cadena ligera del componente Fab del anticuerpo anti-OX40 (SEQ ID NO: 9)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPS
 RFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(e) Cadena pesada del componente Fab del anticuerpo anti-OX40 (SEQ ID NO: 10)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTY
 YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

Figura 11

(a) Cadena pesada del componente Fv de anti-albúmina (SEQ ID NO: 11)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGI IWASGTTFYA
TWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTV
TVSS

(b) Cadena ligera del componente Fv de anti-albúmina (SEQ ID NO: 12)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIKRT

(c) Conector 1 (SEQ ID NO:13)

SGGGGSGGGGTGGGGS

(d) Conector 2 (SEQ ID NO:14)

GGGGSGGGGSGGGGS

(e) A26 Fab Pesada-(G4S,G4T,G4S)-645dsFv(gH5) (SEQ ID NO:15)

EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTY
YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGGSGGGGTGGGGS
EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGI IWASGTTFYA
TWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTV
TVSS

(f) A26 Fab Ligera-(3xG4S)-645dsFv(gL4) (SEQ ID NO:16)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPS
RFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL
TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSP
SSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIKRT

Figura 12

(a) Dominio variable de la cadena pesada 645gH1 (SEQ ID NO:17)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYA
TWAKGRFTISRDTSTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT LVTVS
S

(b) Dominio variable de la cadena ligera 645gL1 (SEQ ID NO:18)

DIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVP
SRFKGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIK

(c) A26 Fab Pesada-(3xG4S)-645dsFv(gH1) (SEQ ID NO:19)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTY
YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGT LVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGGSGGGGSGGGGS
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYA
TWAKGRFTISRDTSTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT LVTVS
S

(d) A26 Fab Ligera-(3xG4S)-645dsFv(gL1) (SEQ ID NO:20)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPS
RFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQS
PSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFGSG
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIK

Figura 13

a) ADN que codifica la cadena pesada de A26-645(gH5) que incluye líder OmpA de *E. coli* (SEQ ID NO: 21)

ATGAAGAAGACTGCTATAGCGATCGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGC
GCAAGCTGAAGTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGA
 GCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACT
 GGATTCGTCAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTG
 GTGGTCTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATG
 ACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAAATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCA
 GTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACC
 CTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCAAGCGTTTCCCACTGGCTCCG
 TCCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTGCCTGGTGAAAGACTAC
 TTCCCAGAACCAGTTACCGTGTCTTGGAACTCTGGTGCCTGACCTCTGGTGTTTAC
 ACCTTTCCAGCAGTTCTCCAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCG
 TTCCGTCTTCTTCTCTGGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGTC
 CAACACCAAGGTCGACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGGCT
 CAGGTGGAGGCGGGACCGGTGGAGGTGGCAGCGAGGTTCAACTGCTTGAGTCTGGA
 GGAGGCCTAGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGTAAGCGGCATC
 GACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAAGCTCCGGGGAAGTGTTTAGA
 ATGGATCGGTATAATATGGGCCAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCCGAAAG
 GAAGGTTTACAATTAGCCGGGACAATAGCAAAAACACCGTGTATCTCCAAATGAAC
 TCCTTGCGAGCAGAGGACACGGCGGTGTACTATTGTGCTCGCACTGTCCAGGTTAT
 AGCACTGCACCCTACTTCGATCTGTGGGGACAAGGGACCCTGGTGACTGTTTCAAGT
 TAA

b) ADN que codifica la cadena pesada de A26-645(gH5) (SEQ ID NO: 22)

GAAGTTCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCG
 TCTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTCGT
 CAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTG
 ACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAA
 AACTCTCCGTACCTGCAAATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTAC
 TGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACT
 GTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCAAGCGTTTCCCACTGGCTCCGTCCTCTAAA
 TCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCAGAA
 CCAGTTACCGTGTCTTGGAACTCTGGTGCCTGACCTCTGGTGTTACACCTTTCCAG
 CAGTTCTCCAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCGGTCTTCT
 TCTCTGGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGTCCAACACCAAG
 GTCGACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGGCTCAGGTGGAGG
 CGGGACCGGTGGAGGTGGCAGCGAGGTTCAACTGCTTGAGTCTGGAGGAGGCCTAG
 TCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGTAAGCGGCATCGACCTGAGCA
 ATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAAGCTCCGGGGAAGTGTTTAGAATGGATCGGT

ATAATATGGGCCAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAAGGAAGGTTTAC
AATTAGCCGGGACAATAGCAAAAACACCGTGTATCTCCAAATGAACTCCTTGCGAG
CAGAGGACACGGCGGTGTACTATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTGCAC
CCTACTTCGATCTGTGGGGACAAGGGACCCTGGTGACTGTTTCAAGTTAA

Figura 14

a) ADN que codifica la cadena ligera de A26-645(gL4) que incluye líder OmpA de E. coli (SEQ ID NO: 23)

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCGTTGGCTGGTTTCGCGACCGTTGCG
CAAGCTGATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGA
 TCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTA
 TCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACGCGAACACTCTGC
 AACTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGAC
 CATCTCCTCTCTCCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGA
 TTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGC
 TCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGTACTGCTTCT
 GTCGTTTGCCTCCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTC
 GACAACGCACTCCAGTCTGGTAACCTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAA
 AGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAA
 ACACAAAGTGACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGAGCTCTCCGGTTACCAA
 ATCCTTTAATAGAGGGGAGTGTGGTGGCGGTGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGAG
 GTGGCGGTTTCAGACATACAAATGACCCAGAGTCCTTCATCGGTATCCGCGTCCGTTG
 GCGATAGGGTGACTATTACATGTCAAAGCTCTCCTAGCGTCTGGAGCAATTTTCTAT
 CCTGGTATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAAACCTTCTGATTTATGAAGCCTCG
 AAACCTACCCAGTGGAGTTCCGTCAAGATTCAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGACTTC
 ACGTTGACAATCAGTTTCGTGCAACCAGAGGACTTTGCGACCTACTATTGTGGTGGGA
 GGTTACAGTAGCATAAGTGATACGACATTTGGGTGCGGTACTAAGGTGGAAATCAA
 ACGTACCTAA

b) ADN que codifica la cadena ligera de A26-645(gL4) (SEQ ID NO: 24)

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGT
 GACTATTACCTGTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCA
 GAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACTG
 GTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTC
 CTCTCTCCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCC
 ACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATC
 CGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGTACTGCTTCTGTGCTT
 TGCCTCCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTCGACAA
 CGCACTCCAGTCTGGTAACCTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTC
 CACCTACTCTCTGTCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA
 AGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGAGCTCTCCGGTTACCAAATCCTT
 TAATAGAGGGGAGTGTGGTGGCGGTGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGCG
 GTTCAGACATACAAATGACCCAGAGTCCTTCATCGGTATCCGCGTCCGTTGGCGATA
 GGGTGACTATTACATGTCAAAGCTCTCCTAGCGTCTGGAGCAATTTTCTATCCTGGT
 ATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAAACCTTCTGATTTATGAAGCCTCGAAACTC
 ACCAGTGGAGTTCCGTCAAGATTCAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGACTTCACGTTG

ACAATCAGTTCGCTGCAACCAGAGGACTTTGCGACCTACTATTGTGGTGGAGGTTAC
AGTAGCATAAGTGATACGACATTTGGGTGCGGTACTAAGGTGGAAATCAAACGTAC
CTAA

Figura 15

a) ADN que codifica la cadena pesada de A26-645(gH5) que incluye la secuencia líder B72.3 (SEQ ID NO: 25)

ATGGAATGGTCTGGGTCTTCCTGTTTTCTTTCTGTCACAACCGGGGTGCACAGCG
AGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGT
CTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCAGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTCTGTC
AGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGA
CGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAA
ACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACT
GCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAAGGTACCTGGTAACTG
TCTCAAGCGCTTCTACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGA
GCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC
GGCTGTCCTACAGTCCTCTGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA
CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTTCCGGAGGTGGCGGTTCCGGA
GGTGGCGGTACCGGTGGCGGTGGATCCGAAGTCCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCGG
ACTCGTGCAGCCCGGAGGCAGTCTTCGCTTGTCTGCGCTGTATCTGGAATCGACCT
GAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAGGCACCTGGGAAATGCCTCGAATGGA
TCGGCATTATATGGGCTAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAGGGTAGAT
TCACAATCTCACGGGATAATAGTAAGAACACAGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGC
GAGCAGAGGATACCGCCGTTTACTATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTG
CACCTACTTTGATCTGTGGGGGCAGGGCACTCTGGTCACCGTCTCGAGTTGA

b) ADN que codifica la cadena pesada de A26-645(gH5) (SEQ ID NO: 26)

GAGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCG
TCTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCAGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTCTG
CAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTG
ACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAA
AACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTAC
TGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAAGGTACCTGGTAACT
GTCTCAAGCGCTTCTACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAG
AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
ACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CGGCTGTCCTACAGTCCTCTGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTTCCGGAGGTGGCGGTTCCGG
AGGTGGCGGTACCGGTGGCGGTGGATCCGAAGTCCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCG
GACTCGTGCAGCCCGGAGGCAGTCTTCGCTTGTCTGCGCTGTATCTGGAATCGACC
TGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAGGCACCTGGGAAATGCCTCGAATGG
ATCGGCATTATATGGGCTAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAGGGTAGA

TTCACAATCTCACGGGATAATAGTAAGAACACAGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTG
CGAGCAGAGGATACCGCCGTTTACTATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACT
GCACCCTACTTTGATCTGTGGGGGCAGGGCACTCTGGTCACCGTCTCGAGTTGA

Figura 16

a) ADN que codifica la cadena ligera de A26-645(gL4) que incluye la secuencia líder B72.3 (SEQ ID NO: 27)

ATGTCAGTTCCACACAGGTGCTGGGCCTGCTTCTGTTGTGGCTCACCGATGCTAGG
TGTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGT
 GTGACTATTACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAG
 CAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAACTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATAC
 CGGTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATC
 TCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTAC
 CCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCA
 TCTGTCTTCATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGTTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGTTG
 TGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGGTGGAT
 AACGCCCTTCAATCCGGAAACTCCCAGGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGA
 CTCCACCTATAGCCTTAGCAGCACACTGACACTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAAC
 ACAAGGTCTACGCCTGCGAAGTGACACATCAAGGCCTGAGCTCACCCGTGACAAAG
 AGCTTTAACAGGGGAGAGTGTGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGTGGCTCCGGAGG
 CGGAGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCTCTGTAAGCGCCAGTGTCCG
 GAGACAGAGTGACTATTACCTGCCAAAGCTCCCCCTCAGTCTGGTCCAATTTTCTAT
 CCTGGTACCAGCAAAAGCCCGGAAAGGCTCCTAAATTGCTGATCTACGAAGCAAGC
 AAACCTACCCAGCGGCGTGCCAGCAGGTTACGCGGCAGTGGGTCTGGAAGTGAAGT
 TACCCTGACAATCTCCTCACTCCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCGGTGG
 AGGTTACAGTAGCATAAGTGATACGACATTTGGATGCGGCACTAAAGTGGAATCA
 AGCGTACCTGA

b) ADN que codifica la cadena ligera de A26-645(gL4) (SEQ ID NO: 28)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGT
 GACTATTACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCA
 GAAACCGGGTAAAGCGCCAAACTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCG
 GTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTC
 CTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCC
 ACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATC
 TGTCTTCATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGTTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGTTGTG
 TGCCTGCTGAATAACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGGTGGATAA
 CGCCCTTCAATCCGGAAACTCCCAGGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGACT
 CCACCTATAGCCTTAGCAGCACACTGACACTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAACAC
 AAGGTCTACGCCTGCGAAGTGACACATCAAGGCCTGAGCTCACCCGTGACAAAGAG
 CTTTAACAGGGGAGAGTGTGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGTGGCTCCGGAGGCG
 GAGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCTCTGTAAGCGCCAGTGTCCGA
 GACAGAGTGACTATTACCTGCCAAAGCTCCCCCTCAGTCTGGTCCAATTTTCTATCCT
 GGTACCAGCAAAAGCCCGGAAAGGCTCCTAAATTGCTGATCTACGAAGCAAGCAAA
 CTCACCAGCGGCGTGCCAGCAGGTTACGCGGCAGTGGGTCTGGAAGTGAAGTGAAGT

CTGACAATCTCCTCACTCCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCGGTGGAGGT
TACAGTAGCATAAGTGATACGACATTTGGATGCGGCACTAAAGTGGAAATCAAGCG
TACCTGA

FIGURA 17

(a) Dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-albúmina (no ds) (SEQ ID NO: 29)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTTFY
ATWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT L
VTVSS

(b) Dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-albúmina (ds) (SEQ ID NO: 30)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYA
TWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT L V
TVSS

(c) Dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-albúmina (no ds) (SEQ ID NO: 31)

DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGG TKVEIKRT

(d) Dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-albúmina (ds) (SEQ ID NO: 32)

DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCG TKVEIKRT

(e) Conector 1 (SEQ ID NO:33) SGGGSGGGGTGGGGS

(f) Conector 2 (SEQ ID NO:34) GGGGSGGGSGGGGS

645 gH5gL4 específico para albúmina (SEQ ID NO: 35)

GAGGTTCAGCTGCTGGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCACGCTGGAGGGAGCCTGCG
TCTCTCTTGTCAGTAAGCGGCATCGACCTGTCCAACTACGCGATTAAGTGGGTACG
TCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAATGGATCGGCATCATCTGGGCCTCTGGTACGA
CCTTCTACGCTACTTGGGCCAAAGGTCGTTTCACCATCTCCCGTGACAACTCTAAAA
ACACCGTGTAACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCGGAAGACACTGCGGTTTACTATT
GCGCGCGTACCGTTCCGGGCTATTCTACTGCACCGTACTTCGACCTGTGGGGTCAGG
GTACTCTGGTTACCGTCTCGAGTGGAGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCCGGTG
GCGGTGGATCGGGAGGTGGCGGTTCTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGT
GTTTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCAGTCCTCTCCGAGCGTTT
GGTCCAACCTTCTGAGCTGGTACCAGCAGAAACCGGGTAAAGCCCCGAAACTGCTG
ATCTACGAGGCGTCTAAACTGACCTCTGGTGTACCGTCCCGTTTCTCTGGCTCTGGCT
CTGGTACGGACTTCACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGACTTTGCAACGT

ACTACTGCGGTGGTGGTTACTCTTCCATCTCTGACACCACGTTTCGGTGGAGGCACCA
AAGTTGAAATCAAACGTACGCATCACCATCACCATCACCATCACCATCAC

645 gH5gL4 específico para albúmina (SEQ ID NO: 36)

EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTTFY
ATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT
LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFL
SWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYS
SISDTTFGGGTKVEIKRTHHHHHHHHHH

645 gH5gL4ds específico para albúmina(SEQ ID NO: 37)

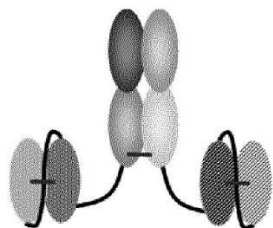
GAGGTTTCAGCTGCTGGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCG
TCTCTCTTGTGCAGTAAGCGGCATCGACCTGTCCAACTACGCGATTAAGTGGGTACG
TCAGGCACCGGGTAAATGCCTGGAATGGATCGGCATCATCTGGGCCTCTGGTACGAC
CTTCTACGCTACTTGGGCCAAAGGTCGTTTACCATCTCCCGTGACAACTCTAAAAA
CACCGTGACCTGCAGATGAAGTCTCTGCGTGCGGAAGACACTGCGGTTTACTATTG
CGCGCGTACCGTTCGGGGCTATTCTACTGCACCGTACTTCGACCTGTGGGGTCAGGG
TACTCTGGTTACCGTCTCGAGTGGAGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCCGGTGG
CGGTGGATCGGGAGGTGGCGGTTCTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTG
TTTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCAGTCCTCTCCGAGCGTTTG
GTCCAACTTCCTGAGCTGGTACCAGCAGAAACCGGGTAAAGCCCCGAAACTGCTGA
TCTACGAGGCGTCTAAACTGACCTCTGGTGTACCGTCCCGTTTCTCTGGCTCTGGCTC
TGGTACGGACTTCACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGACTTTGCAACGTA
CTACTGCGGTGGTGGTTACTCTTCCATCTCTGACACCACGTTTCGGTTGTGGCACCAA
AGTTGAAATCAAACGTACGCATCACCATCACCATCACCATCACCATCAC

645 gH5gL4ds específico para albúmina(SEQ ID NO: 38)

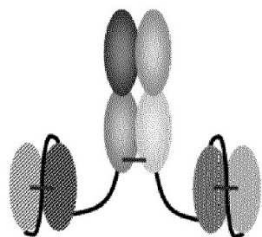
EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYA
TWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT
LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLS
WYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSI
SDTTFGCGTKVEIKRTHHHHHHHHHH

FIGURA 18

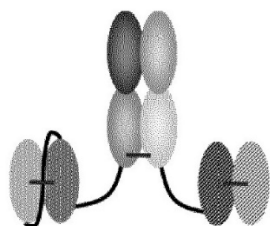
formatos Fab-2x dsscFv y formato Fab-dsscFv-dsFv



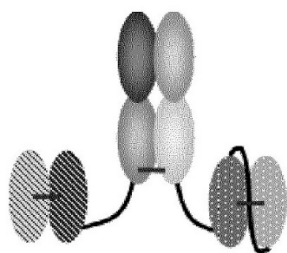
Fab#2-(HC)-dsscFv#3-(LC)-dsscFv#4



Fab#2-(LC)-dsscFv#3-(HC)-dsscFv#4



Fab-(HC)dsscFv-(LC)dsFv



Fab-(HC)dsFv-(LC)dsscFv

FIGURA 19

