

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 945 313**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2016** **PCT/EP2016/058482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016** **WO16166360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2016** **E 16716617 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2023** **EP 3283524**

54 Título: **Construcciones de anticuerpos biespecíficos para CDH3 y CD3**

30 Prioridad:

17.04.2015 EP 15164154

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

30.06.2023

73 Titular/es:

AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH (100.0%)
Staffelseestrasse 2
81477 München, DE

72 Inventor/es:

WEISS, BERTRAM;
FRISK, ANNA-LENA;
ZIERZ, RUPRECHT;
KUFER, PETER;
RAUM, TOBIAS;
RAU, DORIS;
ANLAHR, JONAS;
LUTTERBÜSE, RALF;
NAHRWOLD, LISA;
DAHLHOFF, CHRISTOPH;
BLÜMEL, CLAUDIA y
HOFFMANN, PATRICK

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 945 313 T3

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

DESCRIPCIÓN

Construcciones de anticuerpos biespecíficos para CDH3 y CD3

La presente invención se refiere a una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico que comprende un primer dominio de unión humano que se une a una agrupación de epítomos de CDH3 humana y de macaco en la superficie de una célula diana, y un segundo dominio de unión que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T, en donde la agrupación de epítomos de CDH3 humana está comprendida dentro de las posiciones de aminoácidos 291-363 (SEQ ID NO: 36) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1, en donde los dominios de unión tienen el siguiente formato: pares de las regiones VH y las regiones VL en el formato de un scFv, y en donde la lisis redirigida de células diana a través del reclutamiento de células T por la construcción del anticuerpo implica la formación de sinapsis citotóxicas y el suministro de perforina y granzimas. Además, la invención proporciona un polinucleótido que codifica la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico, un vector que comprende dicho polinucleótido y una célula huésped transformada o transfectada con dicho polinucleótido o vector. Además, la invención proporciona un procedimiento para la producción de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención, un uso médico de dicha construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico y un kit que comprende dicha construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico.

INTRODUCCIÓN:

La superfamilia de cadherinas abarca más de 100 miembros en los seres humanos, incluyendo las llamadas cadherinas clásicas P-cadherina, E-cadherina, N-cadherina y R-cadherina, cada una de las cuales es activa en un conjunto individual de tejidos (Takeichi M. *Development*, 102:639-55 (1988), van Roy F., *Nature Rev.*, V14:121-134 (2014)). Las cadherinas, entre otras cosas, juegan un papel esencial en el desarrollo de tejidos y órganos adultos, así como en la homeostasis de diversos tejidos (Conacci-Sorrell M, et al., *J Clin Invest*, 109:987-91, (2002)). Las cadherinas son glicoproteínas de la transmembrana que regulan los procesos de adhesión célula-célula mediante la formación de uniones dependientes de calcio y convirtiendo los estímulos mecánicos en actividad electroquímica, un proceso al que se alude como mecanotransducción (Gumbiner J. *Cell. Biol.*, 148:399-404 (2000); Yagi, et al., *Genes Dev.*, 14:1169-1180 (2000, Parades et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1826, 297-311 (2012)).

La cadherina placentaria (P-cadherina), también conocida como proteína 3 de adhesión célula-célula dependiente de calcio (CDH3), es una proteína de 118 kDa con un gran dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 800 aminoácidos. El ECD de CDH3 comprende cinco repeticiones de cadherina, denominadas en esta memoria dominios (extracelulares) 1-5 / Dom1-Dom5 / D1-D5, cada uno de las cuales consiste en aproximadamente 110 aminoácidos. Las proteínas con la mayor homología de secuencia con P-cadherina son E-cadherina con una homología de secuencia del 53 % y N-cadherina con una homología del 39 %.

Se considera que el nivel de expresión de P-cadherina es bajo en individuos adultos sanos y se limita a las capas basales o inferiores del epitelio estratificado, incluyendo la próstata y la piel, las células mioepiteliales de mama (Takeichi M. *J Cell Biol* 103:2649-58, (1986) y Shimoyama Y, et al., *Cancer Res*, 49:2128-33(1989)). Aunque no es letal en ratones genéticamente inactivados, se ha demostrado que la pérdida de la función de P-cadherina está asociada con defectos del desarrollo, así como con hiperplasia y displasia del epitelio mamario. (G.L. Radice et al. *J. Cell Biol.* 139: 1025-1032 (1997)).

En contraposición con el bajo nivel de expresión génica en individuos sanos, la expresión de P-cadherina está regulada al alza en el contexto de algunas enfermedades, incluyendo, p. ej., enfermedades inmunitarias tales como la enfermedad de Crohn y la colitis (Hardy, et al., *Gut* 50:513-519 (2002)). Además, se considera que P-cadherina desempeña un papel importante en la naturaleza pro-invasiva de las células cancerosas (Furukawa, et al., *Microscopy Res. Technique* 38 (4):343-352 (1997), Parades et al. *Clin Cancer Res.* 11(16), 5869-5877 (2005), Parades et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1826, 297-311 (2012)). La regulación al alza de P-cadherina se ha descrito en diversos tumores, incluyendo el cáncer colorrectal, de pulmón (NSCLC, por sus siglas en inglés), de mama (triple negativo), de páncreas, de cabeza y cuello, de tiroides, de cuello uterino, de ovario y gástrico (Milic et al. *Cancer Res* 68: (19) 7760-7768 (2008)., Imai et al. *Clin Cancer Res* 14(20) 6487-6495 (2008), Paredes et al. *Clin Cancer Res* 11 (16) 5869-5877 (2005), Dasgupta et al. *Oral Oncology* 42, 306-316 (2006), Jarzab et al. *Cancer Res*; 65: (4) 1587-1597 (2005)., Patel et al. *Int. J. Cancer*: 106, 172-177 (2003), Kim et al. *Human Pathology* 41, 877-885 (2010)). Además, se observó que una mayor expresión de P-cadherina se correlacionaba con bajas tasas de supervivencia de pacientes en diversos tipos de cáncer (Sun L et al. *Am J Pathol.* 2011; 179:380-90; Gamallo, *Modern Pathology*, 14:650-654, (2001); Stefansson, et al., *J. Clin. Oncol.* 22(7):1242-1252 (2004), Parades et al. *Cancer Res.* 64, 8309-8317 (2004)), Taniuchi K et al. *Cancer Res.* 2005; 65:3092-9; Paredes J et al. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:5869-77; Hardy RG et al. *Gut.* 2002; 50:513-9; Peralta Soler A et al. *Cancer.* 1999; 86:1263-72).

Después de las enfermedades cardiovasculares, las neoplasias ocupan el segundo lugar entre las enfermedades que provocan la muerte en la categoría de enfermedades no transmisibles, provocando aproximadamente 8,3 millones de muertes en 2013 en todo el mundo (GBD 2013 *Lancet* 2015; 385: 117-71). El número absoluto de casos de cáncer ha aumentado en un 45,6 % desde 1990, lo que puede atribuirse al hecho de que la población mundial está aumentando, que las personas envejecen y que la prevalencia de factores de riesgo establecidos (p. ej., tabaquismo, sobrepeso,

inactividad física) también está aumentando (GBD 2013 Lancet 2015; 385: 117-71, Torre LA et al. CA Cancer J Clin. 2015; 65:87-108). En los hombres, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte con un número estimado de aproximadamente 1,1 millones de casos al año, seguido por el cáncer de hígado y estómago. En las mujeres, el cáncer de mama es la principal causa de muerte con aproximadamente 0,5 millones de casos al año, seguido del cáncer de pulmón y de colon. Se estima que en 2012 se producirán aproximadamente 14 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, encabezados por el cáncer de pulmón con ~ 1,2 millones de casos en hombres y el cáncer de mama con ~ 1,7 millones en mujeres (Torre LA et al. CA Cancer J Clin. 2015; 65:87-108). En conjunto, el cáncer constituye una gran carga para la sociedad en todo el mundo y existe una gran necesidad de opciones de tratamiento para combatir esta enfermedad.

Estrategias comunes para tratar el cáncer implican cirugía, seguida de quimioterapia, radioterapia o, más recientemente, terapias fijadas al objetivo o combinaciones de las mismas (p. ej., las directrices de NCCN para oncología). Agentes quimioterapéuticos abarcan análogos de nucleótidos tales como 5-fluorouracilo (5-FU), agentes que dañan el ADN tales como oxaliplatino e inhibidores de la topoisomerasa tal como irinotecán o inhibidores de microtúbulos tal como docetaxel, que conducen a la inhibición de la proliferación de células tumorales. Las terapias fijadas al objetivo incluyen, por ejemplo, compuestos de moléculas pequeñas que inhiben selectivamente las quinasas oncogénicas mutadas tal como el compuesto selectivo BRAF V600E vemurafenib (Garbe C. et al Recent Results Cancer Res. 2014;201:215-25), que está aprobado para el tratamiento del melanoma o los inhibidores de la linasa del linfoma anaplásico (ALK, por sus siglas en inglés) crizotinib y ceritinib aprobados para el tratamiento del cáncer de pulmón (Pall G. Curr Opin Oncol. 2015; 27:118-24). Además, existen compuestos basados en anticuerpos tales como cetuximab y panitumumab, que reconocen e inactivan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) y que están aprobados para el tratamiento del cáncer de colon de tipo salvaje KRAS (Tol J, Punt CJ. Clin Ther. 2010; 32:437-53) o trastuzumab, que reconoce Her2 y está aprobado para el tratamiento del cáncer de mama (Ahmed S. et al. Breast Cancer. 2015; 22:101-16).

A pesar del desarrollo de una amplia gama de intervenciones terapéuticas, excepto en casos esporádicos, no existe una cura disponible para esta enfermedad heterogénea. La heterogeneidad de los tumores individuales conduce al hecho de que solo un número limitado de pacientes responde a una determinada terapia y, además, durante la progresión del tumor se desarrolla resistencia contra los agentes terapéuticos (Jamal-Hanjani M. et al Clin Cancer Res. 2015; 21:1258-1266). Finalmente, los efectos secundarios de los fármacos también podrían conducir a la interrupción o suspensión del tratamiento, aunque las terapias fijadas al objetivo recientemente desarrolladas parecen tolerarse mejor (<http://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/chemotherapy/side-effects-chemotherapy>; Sun GC et al. Anticancer Agents Med Chem. 17 de marzo de 2015. [Epub antes de la impresión]).

También por estas razones, todavía existe una gran necesidad médica del desarrollo de nuevos fármacos.

La sobre-expresión de CDH3 en las células tumorales proporciona la base para un nuevo enfoque para tratar los cánceres mediante el uso de un anticuerpo biespecífico que reconoce las células tumorales que sobre-expresan CDH3 y las mata mediante la redirección de las células T citotóxicas que son reconocidas como el resto de unión a CD3 de este anticuerpo.

Los análisis de expresión que se han realizado a nivel de ARN o a nivel de proteína utilizando principalmente la inmunohistoquímica demuestran que CDH3 se expresa a un nivel alto y bien detectable en una amplia gama de diferentes tipos de cáncer, que incluyen el cáncer de colon (Milic et al., Kita et al, Imai et al., <http://www.proteinatlas.org/>), de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas y de células pequeñas (Imai et al, human protein atlas), cánceres de mama preferiblemente triples negativos (Perou et al, Paredes et al, Turashvili et al, Imai et al.), de páncreas (Imai et al., Taniuchi et al.), de cabeza-cuello, incluyendo carcinoma de células escamosas de la lengua (Dasgupta et al; datos propios no publicados), de tiroides (Jarzab et al, Rocha et al., atlas de proteínas humanas), de cuello uterino (Imai et al., Han et al.), de ovario, preferiblemente en estadio II y superior (Patel et al atlas de proteínas humanas), gástrico (Kim et al.; Imai et al.), de endometrio (Sugiyama Y et al. Clin Cancer Res. 2003; 9:5589-600; atlas de proteínas humanas), colangiocarcinoma (Baek S et al. Anat Cell Biol. 2010; 43:110-7; Imai et al.), de vejiga (Imai et al., datos propios no publicados), de próstata (Imai et al.; datos propios no publicados), testicular (Imai et al.), sarcoma de tejido blando (Imai et al.), de esófago (datos propios no publicados), de riñón (datos propios no publicados).

Los análisis futuros pueden demostrar una expresión elevada en tumores adicionales o subtipos de los mismos, que luego también pueden volverse relevantes para una terapia de este tipo. Fotouhi et al., por ejemplo, demostraron una metilación disminuida del promotor CDH3 en tumores neuroendocrinos del intestino delgado, que puede conducir a una expresión elevada de la proteína CDH3 (Fotouhi O et al. Epigenetics. 2014; 9:987-97). Se observó una correlación positiva entre la expresión elevada de CDH3 y miR-205, un micro ARN que parece ser un marcador específico para el carcinoma de células escamosas de pulmón (Huang W et al. Chin Med J (Engl). 2014; 127:272-8).

En contraposición con la expresión elevada de CDH3 en tejido tumoral, su expresión en tejido normal es baja o no detectable (Milic et al., Imai et al., Taniuchi et al., Rocha et al., Dasgupta et al., Han et al., Patel., Kim et al., Sugiyama et al., Jarzab et al., atlas de proteínas humanas). En conjunto, esto proporciona evidencia de que CDH3 es una diana adecuada para el enfoque de anticuerpos biespecíficos propuesto.

Se ha descrito una diversidad de anticuerpos que se unen a P-cadherina y los más caracterizados a fondo se han publicado en las siguientes patentes: WO9919477, WO02/097395, WO04/110345, WO06/114704, WO07/102525, WO2010/001585, WO2010126137; WO2010054007, WO2011056997, WO2011080796, WO2011071541.

Por ejemplo, el documento WO20010/001585 describe anticuerpos anti-CDH3 conjugados con un marcador de radioisótopo. Además, de acuerdo con el documento WO20010/001585, un brazo de unión a un marcador celular anticanceroso puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (p. ej., CD2 o CD3), o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para enfocar los mecanismos de defensa celulares a la célula cancerosa o un brazo que se une al agente citotóxico (p. ej., saporina, anti-interferón-α, alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o isótopo radiactivo hapteno). Algunos de los anticuerpos conocidos en la técnica bloquean la función de CDH3, por ejemplo, interfiriendo con sus propiedades de adhesión, tal como el anticuerpo anti CDH3 PF-03732010 (Zhang CC et al. Clin Cancer Res. 2010; 16:5177-88). In vitro, este anticuerpo conduce a la interrupción de los esferoides 3D con cambios en la señalización intracelular, tal como la disociación de la β-catenina en concentraciones nanomolares, pero no inhibió la proliferación. En modelos preclínicos se observó una inhibición in vivo del crecimiento del tumor y de la formación de metástasis, así como una supervivencia prolongada en modelos preclínicos a dosis de 10 mg/kg y de una forma dependiente del nivel de expresión de CDH3. Mecánicamente, no se puede excluir que los efectos antitumorales in vivo estén mediados adicionalmente por el proceso de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), que implica la muerte celular mediante la unión de células T citotóxicas al dominio Fc de las inmunoglobulinas. Un mecanismo de acción de este tipo se ha atribuido a algunos de los anticuerpos anti-CDH3 reivindicados. A pesar de que el bloqueo de la actividad de la cadherina P se ha descrito como un enfoque para inhibir el crecimiento de los tumores que expresan la cadherina P, los resultados logrados siguen siendo con frecuencia insatisfactorios, ya que retrasan el crecimiento del tumor o, en el mejor de los casos, inducen la estasis tumoral, pero no eliminan el tumor.

Para mejorar su efecto inhibidor sobre el crecimiento del tumor, los anticuerpos pueden conjugarse con agentes citotóxicos o citostáticos (p. ej., un agente quimioterapéutico, una toxina, un isótopo radiactivo o similares), dando como resultado conjugados de anticuerpo-fármaco (ADCs, por sus siglas en inglés) o, en general, inmunoconjugados. Los inmunoconjugados permiten el suministro fijado al objetivo de un resto de fármaco a un tumor y la acumulación intracelular del mismo. La eficacia de inmunoconjugados de este tipo con respecto al exterminio de células tumorales depende en gran medida de diversos parámetros, tales como el comportamiento de internalización de la molécula diana que habitualmente se localiza en la membrana celular con un dominio extracelular, así como el modo de acción del respectivo inmunoconjugado. En general, se ha demostrado que el acoplamiento a un inmunoconjugado potencia significativamente la eficacia antitumoral de diversos anticuerpos.

Más recientemente, las moléculas biespecíficas que se unen a la molécula diana así como a las células T han mostrado resultados prometedores que eluden muchos de los inconvenientes arriba mencionados. Estas moléculas de fármaco no se basan en el bloqueo completo de la función de una diana o en el estado de proliferación de una célula diana, ya que utilizan el efecto de exterminio natural muy efectivo de las células T. Un ejemplo de moléculas biespecíficas de este tipo son las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla anti-diana x anti-CD3 biespecíficos, que se ha demostrado previamente que median en el exterminio de la célula diana relacionado con las células T con una eficacia muy alta, véase, p. ej., Blinatumomab.

Para distinguir una molécula de scFv biespecífica de una buena sustancia farmacológica que finalmente ayudará a curar a los pacientes, se debe cumplir una multiplicidad de criterios diferentes. La combinación y el rigor de estos criterios hacen que la aparición de moléculas que satisfagan estas necesidades sea un evento extremadamente raro e impredecible. El criterio más obvio es la eficiencia de los candidatos a fármaco.

La eficiencia de moléculas de este tipo depende de múltiples parámetros en el dominio de unión a la diana, así como en la parte de la molécula biespecífica que recluta las células T. Especialmente en la parte de unión a la diana de la molécula scFv biespecífica son impredecibles, ya que varían mucho dependiendo de la naturaleza de la molécula diana incluyendo su estructura ternaria así como cuaternaria. Entre los parámetros que definen la eficacia, la cinética de unión entre la molécula de unión diana y la biespecífica, así como la región de unión exacta, el denominado epítipo de unión, desempeña papeles importantes.

Los anticuerpos monoclonales anti-CDH3 - al igual que generalmente cualquier otro anticuerpo monoclonal - funcionan mediante un reconocimiento altamente específico de sus moléculas diana. Reconocen solo un único sitio, o epítipo, en su molécula de CDH3 diana. Además, se ha encontrado que muchos anticuerpos ejercen su función de una manera específica para la especie. Sin embargo, esta especificidad para la especie, inherente no sólo a los anticuerpos monoclonales CDH3 (y fragmentos de los mismos), sino a los anticuerpos monoclonales en general, es un impedimento importante para su desarrollo como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades humanas. Con el fin de obtener la aprobación de comercialización, cualquier nuevo medicamento candidato debe pasar por ensayos rigurosos.

Este ensayo se subdivide en fases preclínica y clínica; mientras que el último se realiza en pacientes humanos, el primero se realiza en animales. El objetivo de los ensayos preclínicos es demostrar que el candidato a fármaco tiene la actividad deseada y, lo que es más importante, es seguro. Solo cuando la seguridad en animales y la posible eficacia del candidato a fármaco se hayan establecido en los ensayos preclínicos, lo más probable es que este candidato a fármaco sea aprobado para ensayos clínicos en seres humanos por parte de la autoridad reguladora respectiva. Los candidatos a fármaco pueden testarse para determinar su seguridad en animales de las siguientes tres maneras: (i) en una especie relevante, es decir, una especie en la que los candidatos a fármaco pueden reconocer los antígenos ortólogos, (ii) en un animal transgénico que contiene los antígenos humanos y (iii) mediante el uso de un sustituto del candidato a fármaco que pueda unirse a los antígenos ortólogos presentes en el animal. Las limitaciones de los animales transgénicos son que esta tecnología se limita típicamente a los roedores. Entre los roedores y el hombre existen diferencias significativas en la fisiología y los resultados de seguridad no pueden extrapolarse fácilmente a los seres humanos. Las limitaciones de un sustituto del candidato a fármaco son la diferente composición de la materia en comparación con el candidato a fármaco real y, a menudo, los animales utilizados son roedores con la limitación que se ha comentado arriba. Por lo tanto, los datos preclínicos generados en roedores tienen un poder predictivo limitado con respecto al candidato a fármaco.

El enfoque de elección para el ensayo de seguridad es el uso de una especie relevante, preferiblemente un primate y, debido a la similitud genética, un chimpancé. Sin embargo, los chimpancés se consideran especies en peligro de extinción y, debido a su naturaleza similar a la humana, el uso de animales de este tipo para ensayos de seguridad de fármacos ha sido prohibido en Europa y está muy restringido en otros lugares.

Aunque los anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos que interactúan con las células T descritos en la técnica tienen un gran potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades malignas, la mayoría de estas moléculas biespecíficas están limitadas porque son específicas para la especie y reconocen solo el antígeno humano, y probablemente la contraparte del primate, es decir, del macaco. Además, la mayoría de dichas moléculas biespecíficas están más limitadas, porque no logran ejercer su función deseada a través de las fronteras entre especies, de modo que pueden reconocer homólogos humanos y de primates, pero no ejercen, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células T.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION:

Como todavía existe la necesidad de disponer de opciones adicionales para el tratamiento de los diversos tipos de cáncer descritos en esta memoria, se proporcionan medios y métodos para la solución de este problema en forma de una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico con un dominio de unión dirigido a CDH3 y con un segundo dominio de unión dirigido a CD3 en las células T.

La presente invención proporciona, en un primer aspecto, una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico que comprende un primer dominio de unión humano que se une a una agrupación de epítopos de CDH3 humana en la superficie de una célula diana, en donde el primer dominio de unión también se une a CDH3 de macaco, preferiblemente a CDH3 de *Macaca fascicularis*, y que comprende un segundo dominio de unión que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T, en donde la agrupación de epítopos de CDH3 humana está comprendida dentro de las posiciones de aminoácidos 291-363 (SEQ ID NO: 36) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1, en donde los dominios de unión tienen el siguiente formato: pares de las regiones VH y las regiones VL en el formato de un scFv, y en donde la lisis redirigida de células diana a través del reclutamiento de células T por la construcción del anticuerpo implica la formación de sinapsis citolíticas y el suministro de perforina y granzimas.

La construcción de anticuerpo biespecífico se caracteriza porque el primer dominio de unión también se une preferiblemente a CDH3 de *Macaca fascicularis*.

Esta funcionalidad en todas las especies significa que la misma molécula se puede utilizar en estudios preclínicos con animales, así como en estudios clínicos en seres humanos. Esto conduce a resultados altamente equiparables y un poder predictivo mucho mayor de los estudios con animales en comparación con las moléculas sustitutas específicas para la especie. Dado que tanto el dominio de unión a CD3 como a CDH3 de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 de la invención son específicos de especies cruzadas y funcionales, es decir, reactivos con los antígenos humanos y de macaco que ejercen un efecto equiparable de citotoxicidad mediada por células T, el mismo puede ser utilizado tanto para la evaluación preclínica de la seguridad, la actividad y/o el perfil farmacocinético de estos dominios de unión en primates y - de forma idéntica - como fármaco en seres humanos. Se entenderá que en una realización preferida, la especificidad entre especies del primer y segundo dominios de unión de las construcciones de anticuerpos de la invención es idéntica.

A la vista de lo anterior, desaparece la necesidad de construir una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico sustituto de CDH3xCD3 para el ensayo en una especie filogenética distante (de seres humanos). Como resultado, se puede utilizar la misma molécula en ensayos preclínicos en animales que se pretende administrar a seres humanos en ensayos clínicos, así como después de la aprobación de comercialización y la administración del fármaco terapéutico. La capacidad de utilizar la misma molécula para ensayos preclínicos en animales que en la administración posterior a seres humanos elimina virtualmente, o al menos reduce en gran medida el peligro de que

los datos obtenidos en los ensayos preclínicos con animales tengan una aplicabilidad limitada al caso humano. En resumen, la obtención de datos preclínicos de seguridad en animales utilizando la misma molécula que se administrará realmente a los seres humanos contribuye en gran medida a garantizar la aplicabilidad de los datos en un escenario relevante para los seres humanos. En contraposición, en los enfoques convencionales que utilizan moléculas sustitutas, dichas moléculas sustitutas tienen que adaptarse molecularmente al sistema de ensayo en animales utilizado para la evaluación de la seguridad preclínica. Por lo tanto, la molécula a utilizar en la terapia humana difiere de hecho en la secuencia y también probablemente en la estructura de la molécula sustituta utilizada en los ensayos preclínicos en parámetros farmacocinéticos y/o actividad biológica, con la consecuencia de que los datos obtenidos en los ensayos preclínicos en animales tienen una aplicabilidad / transferibilidad limitada al caso humano. El uso de moléculas sustitutas requiere la construcción, producción, purificación y caracterización de una construcción completamente nueva. Esto conduce a costos de desarrollo adicionales y al tiempo necesario para obtener esa molécula. En resumen, los sustitutos deben desarrollarse por separado además del fármaco real que se utilizará en la terapia humana, de modo que se deben llevar a cabo dos líneas de desarrollo para dos moléculas. Por lo tanto, una ventaja importante de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3, preferiblemente humana, de la invención, que exhibe especificidad y funcionalidad (es decir, reactividad) entre especies descritas en esta memoria, es que la molécula idéntica se puede utilizar para agentes terapéuticos en seres humanos y en ensayos preclínicos en animales.

Con la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3, específico para especies cruzadas de la invención, ya no es necesario adaptar el animal de ensayo al candidato a fármaco destinado a la administración a seres humanos, tales como, p. ej., la creación de animales transgénicos. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3, preferiblemente humana, de la invención que exhibe especificidad y reactividad entre especies de acuerdo con los usos y los métodos de la invención puede utilizarse directamente para ensayos preclínicos en primates no chimpancés tales como macacos, sin manipulación genética alguna de los animales. Como es bien conocido por los expertos en la técnica, los enfoques en los que el animal de ensayo se adapta al candidato a fármaco siempre conllevan el riesgo de que los resultados obtenidos en los ensayos preclínicos de seguridad sean menos representativos y predictivos para seres humanos debido a la modificación del animal. Por ejemplo, en los animales transgénicos, las proteínas codificadas por los transgenes suelen estar muy sobre-expresadas. Por lo tanto, los datos obtenidos para la actividad biológica de un anticuerpo contra este antígeno proteico pueden tener un valor predictivo limitado para seres humanos en los que la proteína se expresa a niveles mucho más bajos y más fisiológicos.

Una ventaja adicional de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3, preferiblemente humana, de la invención es la capacidad de extraer múltiples muestras de sangre cuando se utiliza como parte de ensayos preclínicos en animales, por ejemplo, en el curso de estudios farmacocinéticos en animales. Extracciones de sangre múltiples se pueden obtener mucho más fácilmente con un primate que no sea un chimpancé que con animales inferiores, p. ej., un ratón. La extracción de múltiples muestras de sangre permite el ensayo continuo de parámetros sanguíneos para la determinación de los efectos biológicos inducidos por la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3 de la invención. Además, la extracción de múltiples muestras de sangre permite al investigador evaluar el perfil farmacocinético de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3, preferiblemente humano, de la invención tal como se define en esta memoria. Además, los efectos secundarios potenciales, que pueden ser inducidos por dicha construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3 de la invención reflejados en parámetros sanguíneos, pueden medirse en diferentes muestras de sangre extraídas durante el curso de la administración de dicho anticuerpo.

Las ventajas de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3 de la invención tal como se define en esta memoria que exhibe especificidad entre especies pueden resumirse brevemente como sigue:

En primer lugar, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3 de la invención, tal como se define en esta memoria, utilizada en ensayos preclínicos es la misma que la utilizada en terapia humana. Por lo tanto, ya no es necesario desarrollar dos moléculas independientes, que pueden diferir en sus propiedades farmacocinéticas y actividad biológica. Esto es muy ventajoso porque, p. ej., los resultados farmacocinéticos son más directamente transferibles y aplicables al entorno humano que, p. ej., en enfoques alternativos convencionales.

En segundo lugar, los usos de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3 de la invención, tal como se define en esta memoria, para la preparación de agentes terapéuticos en seres humanos son menos costosos y laboriosos que los enfoques sustitutos.

En tercer lugar, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3 de la invención, tal como se define en esta memoria, se puede utilizar para ensayos preclínicos no solo en una especie de primate, sino en una serie de especies de primates diferentes, lo que limita el riesgo de potenciales diferencias de especie entre primates y seres humanos.

En cuarto lugar, el chimpancé como especie en peligro de extinción para la ensayo con animales puede evitarse si se desea.

En quinto lugar, se pueden extraer múltiples muestras de sangre para estudios farmacocinéticos extensos.

En sexto lugar, debido al origen humano de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de acuerdo con una realización preferida de la invención, la generación de una reacción inmunitaria contra dichas moléculas de unión se minimiza cuando se administran a pacientes humanos. Se excluye la inducción de una respuesta inmunitaria con anticuerpos específicos para un candidato a fármaco derivado de una especie no humana tal como, p. ej., un ratón que conduzca al desarrollo de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMAs, por sus siglas en inglés) contra moléculas terapéuticas de origen murino.

El uso terapéutico de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3 de la invención proporciona un enfoque terapéutico novedoso e inventivo para el cáncer, preferiblemente tumores sólidos, más preferiblemente carcinomas y otras indicaciones de cáncer que se enumeran más adelante. Como se muestra en los siguientes ejemplos, la construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla CDH3xCD3 de la invención proporciona una herramienta ventajosa con el fin de exterminar células cancerosas humanas que expresan CDH3. Además, la actividad citotóxica de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 de la invención proporciona un modo de acción ventajoso en comparación con las moléculas IgG (monoespecíficas) clásicas o ADCs.

Para la caracterización de candidatos a fármacos en modelos animales, es esencial una reactividad cruzada de especie con una especie animal relevante y la brecha de afinidad entre especies debe mantenerse por debajo de una diferencia de afinidad de 10 veces para garantizar una configuración de modelo animal predictivo. Se considera que los monos macacos (y especialmente cynomolgus) se encuentran entre las especies más relevantes para los ensayos de eficacia y toxicidad con el valor predictivo más alto. Para analizar si las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos cumplen los criterios de eficiencia, se deben desarrollar y calificar los respectivos ensayos de citotoxicidad.

Para evitar efectos secundarios adversos, debe asegurarse de que la parte de unión a la diana de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico se una específicamente a la cadherina P y a ninguno de sus homólogos más cercanos arriba descritos u otras proteínas presentes en el cuerpo.

Las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de la presente invención no se unen preferiblemente al dominio extracelular D1 de CHD3 (posiciones 108-215 de SEQ ID NO: 1), preferiblemente no se unen al dominio extracelular D4 de CHD3 (posiciones 441-546 de SEQ ID NO: 1), y preferiblemente no se unen al dominio extracelular D5 de CHD3 (posiciones 547-650 de SEQ ID NO: 1).

De acuerdo con la realización más preferida de la presente invención, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico se caracteriza porque el primer dominio de unión humano se une a un epítipo que está comprendido dentro de las posiciones de aminoácidos 291-327 (SEQ ID NO: 34) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1, en donde los dominios de unión tienen el siguiente formato: pares de las regiones VH y las regiones VL en el formato de un scFv, y en donde la lisis redirigida de células diana a través del reclutamiento de células T por la construcción del anticuerpo implica la formación de sinapsis citolíticas y el suministro de perforina y granzimas. Los anticuerpos que se unen específicamente a las posiciones de aminoácidos 291-327 (SEQ ID NO: 34), preferiblemente no se unen al CHD3 dominio extracelular D3 de CHD3 humana (posiciones 328-440 de SEQ ID NO: 1).

Una construcción de anticuerpo preferida de acuerdo con la invención también se puede definir como una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico que comprende un primer dominio de unión humano que se une a un epítipo de CDH3 humana y de macaco en la superficie de una célula diana y un segundo dominio de unión que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T, en donde los dominios de unión tienen el siguiente formato: pares de regiones VH y regiones VL en el formato de un scFv, y en donde la lisis redirigida de las células diana mediante el reclutamiento de células T por la construcción de anticuerpo implica la formación de sinapsis citolítica y el suministro de perforina y granzimas, en donde la construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla se une al mismo epítipo que o compete por unirse a CDH3 con el anticuerpo denominado CDH3-11, CDH3-12, CDH3-13 o CDH3-14, es decir, el anticuerpo que comprende:

- una región VH como se representa en SEQ ID NO: 155 y una región VL como se representa en SEQ ID NO: 156,
- una región VH como se representa en SEQ ID NO: 165 y una región VL como se representa en SEQ ID NO: 166,
- una región VH como se representa en SEQ ID NO: 175 y una región VL como se representa en SEQ ID NO: 176; o
- una región VH como se representa en SEQ ID NO: 185 y una región VL como se representa en SEQ ID NO: 186.

En otro aspecto de la presente invención, la construcción de anticuerpo biespecífico se caracteriza porque el primer dominio de unión se une a un epítipo que está comprendido dentro de las posiciones de aminoácidos 328-363 (SEQ ID NO: 35) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1, en donde el primer dominio de unión también se une preferiblemente a un epítipo que está comprendido dentro de las posiciones de aminoácidos 404-440 (SEQ ID NO: 390) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1, en donde los dominios de unión tienen el siguiente formato: pares de las regiones VH y las regiones VL en el formato de un scFv, y en donde la lisis redirigida de células diana a través del reclutamiento de células T por la construcción del anticuerpo implica la formación de sinapsis citolíticas y el suministro de perforina y granzimas.

Una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico preferida de acuerdo con la invención también se puede definir como una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico que comprende un primer dominio de unión humano que se une a un epítipo de CDH3 humana y de macaco en la superficie de una célula diana y un segundo dominio de unión que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T, en donde los dominios de unión tienen el siguiente formato: pares de regiones VH y regiones VL en el formato de un scFv, y en donde la lisis redirigida de las células diana mediante el reclutamiento de células T por la construcción de anticuerpo implica la formación de sinapsis citolítica y el suministro de perforina y granzimas, en donde la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico se une al mismo epítipo que o compite por unirse a CDH3 con el anticuerpo denominado CDH3-24, es decir, el anticuerpo que comprende una región VH como se representa en SEQ ID NO: 285 y una región VL como se representa en SEQ ID NO: 286.

Otra construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico preferida de acuerdo con la invención también puede definirse como una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico que comprende un primer dominio de unión humano que se une a un epítipo de CDH3 humana o de macaco en la superficie de una célula diana y un segundo dominio de unión que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T, en donde la construcción de anticuerpo se une al mismo epítipo que o compite por unirse a CDH3 con la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico denominada CDH3-25, CDH3-26 o CDH3-27, es decir, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico que comprende:

- una región VH como se representa en SEQ ID NO: 295 y una región VL como se representa en SEQ ID NO: 296,
- una región VH como se representa en SEQ ID NO: 305 y una región VL como se representa en SEQ ID NO: 306, o
- una región VH como se representa en SEQ ID NO: 315 y una región VL como se representa en SEQ ID NO: 316.

El que una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico compita o no por la unión con otra construcción de anticuerpo dada puede medirse en un ensayo de competición tal como un ELISA competitivo o un ensayo de competición basado en células. También se pueden utilizar micropartículas (perlas) acopladas a avidina. De manera similar a una placa ELISA recubierta de avidina, cuando se hace reaccionar con una proteína biotinilada, cada una de estas perlas se puede utilizar como un sustrato sobre el cual se puede realizar un ensayo. El antígeno se recubre sobre una perla y luego se recubre con el primer anticuerpo. Se añade el segundo anticuerpo y se determina cualquier unión adicional. La lectura se produce mediante citometría de flujo.

En otra realización de la presente invención, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico se caracteriza porque el primer dominio de unión se une a un epítipo que está comprendido dentro de las posiciones de aminoácidos 328-363 (SEQ ID NO: 35) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1 y a un epítipo que está comprendido dentro de las posiciones de aminoácidos 404-440 (SEQ ID NO: 390) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1.

Además, las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de la presente invención no se unen a un epítipo que está comprendido dentro de las posiciones de aminoácidos 216-252 o 253-290 de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1.

Además, las construcciones de anticuerpos de la presente invención no se unen a un epítipo que está comprendido dentro de las posiciones de aminoácidos 364-403 de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1.

Las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos que se unen específicamente a un epítipo que está comprendido en las posiciones de aminoácidos 328-363 (SEQ ID NO: 35) no se unen al CHD3 dominio extracelular D2 de CDH3 humana (posiciones 216-327 de SEQ ID NO: 1).

Una ventaja de la presente invención es la provisión de una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico que comprende un dominio de unión que se une a CD3 humana y un dominio de unión capaz de unirse a CDH3 humana, mientras que ambos dominios de unión exhiben una especificidad entre especies para CDH3 de seres humanos y macacos. Inesperadamente, se encontró que las construcciones de anticuerpos de cadena sencillas

biespecíficos CDH3xCD3 de la invención no solo se unen específicamente a los homólogos de CDH3 humanas y de macacos de CDH3 y CD3, sino que también ejercen citotoxicidad mediada por células T en sistemas de ensayo de CDH3 humanas y de macacos. Ventajosamente, la presente invención proporciona construcciones de anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla CDH3xCD3 que muestran citotoxicidad mediada por células T en seres humanos y macacos. Esta ventaja se logra mediante construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 que se unen a una agrupación de epítomos comprendida dentro de las posiciones de aminoácidos 291-363 (SEQ ID NO: 36) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1, en donde los dominios de unión tienen el siguiente formato: pares de las regiones VH y las regiones VL en el formato de un scFv, y en donde la lisis redirigida de células diana a través del reclutamiento de células T por la construcción del anticuerpo implica la formación de sinapsis citolíticas y el suministro de perforina y granzimas.

Debe tenerse en cuenta que, como se utiliza en esta memoria, las formas en singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de dichos reactivos diferentes y la referencia al "método" incluye una referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en esta memoria.

A menos que se indique lo contrario, la expresión «al menos» que precede a una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada uno de los elementos de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, utilizando únicamente una experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en esta memoria. Se pretende que equivalentes de este tipo estén incluidos en la presente invención.

El término "y/o" siempre que se utilice en esta memoria incluye el significado de "y", "o" y "todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término".

El término "aproximadamente" o "alrededor", tal como se utiliza en esta memoria significa dentro de $\pm 20\%$, preferiblemente dentro de $\pm 15\%$, más preferiblemente dentro de $\pm 10\%$ y lo más preferiblemente dentro de $\pm 5\%$ de un valor o intervalo dado.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas establecidos, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapa. Cuando se utiliza en esta memoria, la expresión "que comprende" puede sustituirse con la expresión "que contiene" o "que incluye" o, a veces, cuando se utiliza en esta memoria, con la expresión "que tiene".

Cuando se utiliza en esta memoria, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de la reivindicación. Cuando se utiliza en esta memoria, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la reivindicación.

En cada caso en esta memoria, cualquiera de las expresiones "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede reemplazarse por cualquiera de las otras dos expresiones.

La expresión "construcción de anticuerpo" se refiere a una molécula en la que la estructura y/o la función se basan en la estructura y/o función de un anticuerpo, p. ej., de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o entera, en la que los dominios de unión tienen el siguiente formato: pares de regiones VH y regiones VL en el formato de un scFv. Por lo tanto, una construcción de anticuerpo es capaz de unirse a su diana o antígeno específico. Además, una construcción de anticuerpo de acuerdo con la invención comprende los requisitos estructurales mínimos de un anticuerpo que permiten la unión de la diana. Este requisito mínimo puede estar definido, p. ej., por la presencia de al menos las tres CDRs de la cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL) y/o las tres CDRs de la cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH), preferiblemente de las seis CDRs. Los anticuerpos en los que se basan las construcciones de acuerdo con la invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, recombinantes, quiméricos, desinmunizados, humanizados y humanos.

Dentro de la definición de "construcciones de anticuerpos" de acuerdo con la invención están los anticuerpos de inmunoglobulina de cadena sencilla generados por métodos o procedimientos biotecnológicos o de ingeniería de proteínas. También dentro de la definición de "construcciones de anticuerpos" están los fragmentos de anticuerpos de longitud completa, tales como VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')₂ o "r IgG" ("medio anticuerpo"). Las construcciones de anticuerpos de acuerdo con la invención también pueden ser fragmentos modificados de anticuerpos, también denominados variantes de anticuerpos, tales como scFv, di-scFv o bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-cremallera, scFab, Fab2, Fab3, diacuerpos, diacuerpos de cadena sencilla, diacuerpos en tándem (Tandab), di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem, "minicuerpos" ejemplificados por una estructura que es la siguiente: (VH-VL-CH3)₂, (scFv-CH3)₂, ((scFv)₂-CH3 + CH3), ((scFv)₂-CH3) o (scFv-CH3-scFv)₂, multicuerpos tales como triacuerpos o tetracuerpos, y anticuerpos de dominio único tales como nanocuerpos o anticuerpos de dominio variable único que

comprenden simplemente un dominio variable, que podría ser VHH, VH o VL, que se une específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de otras regiones o dominios V.

Además, la definición de la expresión "construcciones de anticuerpos" incluye construcciones monovalentes, bivalentes y polivalentes / multivalentes y, por lo tanto, construcciones monoespecíficas, que se unen específicamente a una sola estructura antigénica, así como construcciones biespecíficas y poliespecíficas / multiespecíficas, que se unen específicamente a más de una estructura antigénica, p. ej., dos, tres o más, a través de distintos dominios de unión. Además, la definición de la expresión "construcciones de anticuerpos" se refiere a moléculas que consisten en una sola cadena polipeptídica. Ejemplos de los anticuerpos arriba identificados y variantes o derivados de los mismos se describen, *inter alia* en Harlow y Lane, Antibodies a laboratory manual, CSHL Press (1988) y Using Antibodies: a laboratory manual, CSHL Press (1999), Kontermann y Dübel, Antibody Engineering, Springer, 2ª ed. 2010 y Little, Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Cambridge University Press 2009.

Las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de la presente invención son preferiblemente "construcciones de anticuerpos generadas *in vitro*". Esta expresión se refiere a una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con la definición anterior en la que toda o parte de la región variable (p. ej., al menos una CDR) se genera en una selección de células no inmunitarias, p. ej., una muestra de fagos *in vitro*, chip de o cualquier otro método en el que las secuencias candidatas puedan testarse para determinar su capacidad de unirse a un antígeno. Por lo tanto, esta expresión excluye preferiblemente las secuencias generadas únicamente por transposición genómica en una célula inmune en un animal. Un "anticuerpo recombinante" es un anticuerpo elaborado mediante el uso de tecnología de ADN recombinante o ingeniería genética.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) o construcción de anticuerpo monoclonal, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales y/o post-modificaciones de traducción (p. ej., isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico o determinante en el antígeno, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (o epítopos). Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque son sintetizados por el cultivo de hibridoma y, por tanto, no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera la producción del anticuerpo por método particular alguno.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede utilizarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares continuas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar se pueden producir mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Koehler et al., Nature, 256: 495 (1975), o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la Patente de EE.UU. Nº 4.816.567). Ejemplos de técnicas adicionales para producir anticuerpos monoclonales humanos incluyen la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77- 96).

Luego, los hibridomas pueden rastrearse utilizando métodos estándar, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el análisis de resonancia de plasmón de superficie (BIAcore™), para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno específico. Puede utilizarse cualquier forma del antígeno relevante como inmunógeno, p. ej., antígeno recombinante, formas que se producen de forma natural, cualquier variante o fragmento del mismo, así como un péptido antigénico del mismo. La resonancia de plasmones de superficie, tal como se emplea en el sistema BIAcore, se puede utilizar para aumentar la eficacia de los anticuerpos de fago que se unen a un epítipo de un antígeno diana, tal como CDH3 o CD3 épsilon (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13).

Otro método ejemplar para preparar anticuerpos monoclonales incluye el rastreo de colecciones de expresión de proteínas, p. ej., colecciones de presentación de fagos o presentación de ribosomas. La presentación de fagos se describe, por ejemplo, en Ladner et al., Patente de EE.UU. Nº 5.223.409; Smith (1985) Science 228:1315-1317, Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991).

Además del uso de colecciones de presentación, el antígeno relevante puede utilizarse para inmunizar un animal no humano, p. ej., un roedor (tal como un ratón, hámster, conejo o rata). En una realización, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible modificar cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humana (inmunoglobulina). Utilizando la tecnología de hibridomas, pueden producirse y seleccionarse anticuerpos monoclonales específicos para antígeno derivados de los genes con la especificidad deseada. Véase, p. ej., XENOMOUSE™, Green et al. (1994) Nature Genetics 7:13-21, documentos US 2003-0070185, WO 96/34096 y WO 96/33735.

También puede obtenerse un anticuerpo monoclonal de un animal no humano y luego modificarse, p. ej., humanizarse, desinmunizarse, volverse quimérico, etc., utilizando técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Ejemplos de construcciones de anticuerpos modificados incluyen variantes humanizadas de anticuerpos no humanos, anticuerpos "madurados por afinidad" (véase, p. ej. Hawkins et al. J. Mol. Biol. 254, 889-896 (1992) y Lowman et al., Biochemistry 30, 10832- 10837 (1991)) y mutantes de anticuerpos con función(es) efectora(s) alterada(s) (véase, p. ej., la Patente de EE.UU. 5.648.260, Kontermann y Dübel (2010), *loc. cit.* y Little (2009), *loc. cit.*).

En inmunología, la maduración por afinidad es el proceso mediante el cual las células B producen anticuerpos con mayor afinidad por el antígeno durante el curso de una respuesta inmune. Con exposiciones repetidas al mismo antígeno, un huésped producirá anticuerpos de afinidades sucesivamente mayores. Al igual que el prototipo natural, la maduración por afinidad *in vitro* se basa en los principios de mutación y selección. La maduración por afinidad *in vitro* se ha utilizado con éxito para optimizar anticuerpos, construcciones de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Las mutaciones aleatorias dentro de las CDRs se introducen utilizando radiación, mutágenos químicos o PCR propensa a errores. Además, la diversidad genética se puede incrementar mediante la transposición de la cadena. Dos o tres rondas de mutación y selección utilizando métodos de presentación tales como la presentación de fagos generalmente dan como resultado fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo nanomolar bajo.

Un tipo preferido de variación por sustitución de aminoácidos de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos implica la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (p. ej., un anticuerpo humano o humanizado). Generalmente, la o las variantes resultantes seleccionadas para un desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental a partir del cual se generan. Una forma conveniente de generar variantes de sustitución de este tipo implica la maduración por afinidad utilizando presentación de fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de la región hipervariable (p. ej., 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpos así generadas se presentan de forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos en forma de fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada una de las partículas. Las variantes presentadas en fagos se rastrean luego para determinar su actividad biológica (p. ej., afinidad de unión) tal como se describe en esta memoria. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede realizar una mutagénesis de exploración de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. Alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el dominio de unión y, p. ej., CDH3 humana. Residuos de contacto de este tipo y residuos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en esta memoria. Una vez que se generan variantes de este tipo, el panel de variantes se somete a rastreo tal como se describe en esta memoria y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para su posterior desarrollo.

Las construcciones de anticuerpos monoclonales biespecíficos de cadena sencilla de la presente invención incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de anticuerpos de este tipo, por lo que siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de EE.UU. N° 4.816.567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en esta memoria incluyen anticuerpos "primitizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (p. ej., mono del Viejo Mundo, simio, etc.) y secuencias de región constante humana. Se ha descrito una diversidad de enfoques para preparar anticuerpos quiméricos. Véase, p. ej., Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985, Cabilly et al., Patente de EE.UU. N° 4.816.567; Boss et al., Patente de EE.UU. N° 4.816.397; Tanaguchi et al., documentos EP 0171496; EP 0173494; y GB 2177096.

Una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico también puede modificarse mediante la delección específica de epítopos de células T humanas (un método denominado "desinmunización") mediante los métodos descritos, por ejemplo, en los documentos WO 98/52976 o WO 00/34317. Brevemente, los dominios variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo pueden analizarse en busca de péptidos que se unen a MHC de clase II; estos péptidos representan epítopos de células T potenciales (como se define en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de epítopos de células T potenciales, se puede aplicar un enfoque de modelado informático denominado "enhebrado de péptidos" y, además, se puede buscar en una base de datos de péptidos de unión a MHC de clase II humanos los motivos presentes en las secuencias VH y VL, como se describe en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos motivos se unen a cualquiera de los 18 alotipos principales de DR del MHC de clase II y, por tanto, constituyen epítopos potenciales de células T. Los epítopos de células T potenciales detectados pueden eliminarse sustituyendo pequeños números de residuos de aminoácidos en los dominios variables, o preferiblemente, mediante sustituciones de un solo aminoácido.

Típicamente, se realizan sustituciones conservadoras. A menudo, pero no exclusivamente, se puede utilizar un aminoácido común a una posición en las secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana. Secuencias de la línea germinal humana se describen, p. ej. en Tomlinson, et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G.P. et al.

(1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; y Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14: 14:4628- 4638. El directorio V BASE proporciona un directorio completo de secuencias de regiones variables de inmunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, LA. *et al.* MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido). Estas secuencias se pueden utilizar como una fuente de secuencia humana, *p. ej.*, para regiones marco y CDRs. También se pueden utilizar regiones de armazón humano consenso, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. N° 6.300.064.

Los anticuerpos "humanizados", construcciones de anticuerpos o fragmentos de los mismos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a antígenos) son anticuerpos o inmunoglobulinas de secuencias mayoritariamente humanas, que contienen (a) secuencia(s) mínima(s) derivada(s) de inmunoglobulina humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable (también CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (*p. ej.*, roedor) (anticuerpo donante), tales como ratón, rata, hámster o conejo que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de la región marco (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, "anticuerpos humanizados", tal como se utiliza en esta memoria, también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

Pueden generarse anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos reemplazando secuencias del dominio variable Fv que no están directamente implicadas en la unión de antígenos con secuencias equivalentes de dominios variables Fv humanos. Métodos ejemplares para generar anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos se proporcionan por Morrison (1985) Science 229:1202-1207; por Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; y mediante los documentos US 5.585.089; US 5.693.761; US 5.693.762; US 5.859.205; y US 6.407.213. Esos métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican todo o parte de los dominios variables Fv de inmunoglobulina de al menos uno de una cadena pesada o ligera. Dichos ácidos nucleicos pueden obtenerse de un hibridoma que produzca un anticuerpo contra una diana predeterminada, tal como se describió arriba, así como de otras fuentes. El ADN recombinante que codifica la molécula de anticuerpo humanizado puede luego clonarse en un vector de expresión apropiado.

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

Un anticuerpo humanizado puede optimizarse mediante la introducción de sustituciones conservadoras, sustituciones de secuencia consenso, sustituciones de la línea germinal y/o mutaciones inversas. Moléculas de inmunoglobulina alteradas de este tipo pueden fabricarse mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en la técnica (*p. ej.*, Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson et al., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982, y documento EP 239 400).

La expresión "anticuerpo humano", "construcción de anticuerpo humano" y "dominio de unión humano" incluye anticuerpos, construcciones de anticuerpos y dominios de unión que tienen regiones de anticuerpos tales como regiones variables y constantes o dominios que corresponden sustancialmente a secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los descritos por Kabat *et al.* (1991) (*loc. cit.*). Los anticuerpos humanos, construcciones de anticuerpos o dominios de unión de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (*p. ej.*, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDRs y, en particular, en CDR3. Los anticuerpos, las construcciones de anticuerpos o los dominios de unión humanos pueden tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o más posiciones reemplazadas por un residuo de aminoácido que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana. La definición de anticuerpos humanos, construcciones de anticuerpos y dominios de unión, tal como se utiliza en esta memoria también contempla anticuerpos completamente humanos, que incluyen solo secuencias humanas de anticuerpos alteradas no artificialmente y/o genéticamente, ya que se pueden derivar utilizando tecnologías o sistemas tales como el Xenomouse.

En algunas realizaciones, las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de la invención son construcciones de anticuerpos "aisladas" o "sustancialmente puras". "Aislado" o "sustancialmente puro", cuando se utiliza para describir la construcción de anticuerpo descrita en esta memoria, significa una construcción de anticuerpo que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno de producción. Preferiblemente, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico está libre o sustancialmente libre de asociación con todos

los demás componentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tales como el resultante de células transfectadas recombinantes, son materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. Las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos pueden constituir, p. ej., al menos aproximadamente el 5 %, o al menos aproximadamente el 50 % en peso de la proteína total en una muestra dada. Se entiende que la proteína aislada puede constituir del 5% al 99,9% en peso del contenido total de proteína, dependiendo de las circunstancias. El polipéptido se puede preparar a una concentración significativamente mayor mediante el uso de un promotor inducible o un promotor de alta expresión, de modo que se produzca a niveles de concentración incrementados. La definición incluye la producción de una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico en una amplia diversidad de organismos y/o células huésped que se conocen en la técnica. En realizaciones preferidas, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico se purificará (1) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Normalmente, sin embargo, se preparará una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico aislada mediante al menos una etapa de purificación.

La expresión "dominio de unión" caracteriza en relación con la presente invención un dominio que (específicamente) se une a / interactúa con / reconoce un epítipo diana dado o un sitio diana dado en las moléculas diana (antígenos) CDH3 y CD3, respectivamente, en donde los dominios de unión tienen el siguiente formato: pares de regiones VH y regiones VL en el formato de un scFv. La estructura y función del primer dominio de unión (que reconoce CDH3), y preferiblemente también la estructura y/o función del segundo dominio de unión (CD3), se basa/n en la estructura y/o función de un anticuerpo, p. ej., de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o entera. De acuerdo con la invención, el primer dominio de unión humano se caracteriza por la presencia de tres CDRs de la cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL) y tres CDRs de la cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH). El segundo dominio de unión también comprende los requisitos estructurales mínimos de un anticuerpo que permiten la unión a la diana. El segundo dominio de unión comprende al menos tres CDRs de la cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL) y/o tres CDRs de la cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH). Se prevé que el primer y/o segundo dominio de unión se produzca o se pueda obtener mediante métodos de rastreo de fagotecas o presentación de fagos en lugar de injertar secuencias de CDR de un anticuerpo (monoclonal) preexistente en un armazón.

De acuerdo con la presente invención, los dominios de unión están en forma de polipéptidos. Dichos polipéptidos pueden incluir partes proteicas y partes no proteicas (p. ej., enlazadores químicos o agentes reticulantes químicos tales como glutaraldehído). Las proteínas (incluidos fragmentos de las mismas, preferiblemente fragmentos biológicamente activos, y péptidos, que habitualmente tienen menos de 30 aminoácidos) comprenden dos o más aminoácidos acoplados entre sí mediante un enlace peptídico covalente (dando como resultado una cadena de aminoácidos). El término "polipéptido", tal como se utiliza en esta memoria, describe un grupo de moléculas, que habitualmente consiste en más de 30 aminoácidos. Los polipéptidos pueden formar, además, multímeros tales como dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en más de una molécula de polipéptido. Las moléculas de polipéptido que forman este tipo de dímeros, trímeros, etc. pueden ser idénticas o no idénticas. Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" también se refieren a péptidos / polipéptidos / proteínas modificados de forma natural, en donde la modificación se efectúa, p. ej., mediante modificaciones postraduccionales, tales como glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Un "péptido", "polipéptido" o "proteína" cuando se le alude en esta memoria también puede modificarse químicamente, tal como pegarse. Modificaciones de este tipo son bien conocidas en la técnica y se describen más adelante en esta memoria.

Como se mencionó arriba, un dominio de unión de acuerdo con la invención tiene el formato de una región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo y una región variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo en el formato de un scFv. Los fragmentos Fd, por ejemplo, tienen dos regiones VH y a menudo conservan alguna función de unión a antígeno del dominio de unión a antígeno intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno (modificados) incluyen (1) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que tiene los dominios VL, VH, CL y CH1; (2) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (3) un fragmento Fd que tiene los dos dominios VH y CH1; (4) un fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (5) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341 :544-546), que tiene un dominio VH; (6) una región determinante de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) aislada, y (7) un Fv de cadena sencilla (scFv), prefiriéndose este último (por ejemplo, derivado de una colección de scFv). Ejemplos de realizaciones de construcciones de anticuerpos de acuerdo con la invención se describen, p. ej., en los documentos WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, US 2014/0308285, US 2014/0302037, W O2014/144722, WO 2014/151910 y WO 2015/048272.

El dominio de unión que se une a CDH3 y/o el dominio de unión que se une a CD3 es/son dominios de unión humanos. Los anticuerpos y las construcciones de anticuerpos que comprenden al menos un dominio de unión humano evitan algunos de los problemas asociados con los anticuerpos o las construcciones de anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes no humanas tales como roedores (p. ej., murino, rata, hámster o conejo). La presencia de proteínas de este tipo derivadas de roedores puede conducir al rápido aclaramiento de los anticuerpos o construcciones de anticuerpos o puede conducir a la generación de una respuesta inmune contra el anticuerpo o la

construcción de anticuerpos por parte de un paciente. Para evitar el uso de anticuerpos o construcciones de anticuerpos derivados de roedores, se pueden generar anticuerpos / construcciones de anticuerpos humanos o completamente humanos mediante la introducción de la función de anticuerpos humanos en un roedor, de modo que el roedor produzca anticuerpos completamente humanos.

La capacidad de clonar y reconstruir loci humanos del tamaño de una megabase en YACs e introducirlos en la línea germinal del ratón proporciona un enfoque poderoso para dilucidar los componentes funcionales de loci muy grandes o mapeados de forma burda, así como para generar modelos útiles de enfermedades humanas. Además, el uso de una tecnología de este tipo para la sustitución de loci de ratón con sus equivalentes humanos podría proporcionar conocimientos únicos sobre la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas y su participación en la inducción y progresión de enfermedades.

Una aplicación práctica importante de una estrategia de este tipo es la "humanización" del sistema inmune humoral del ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina humana (Ig) en ratones en los que los genes de Ig endógenos han sido inactivados ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos subyacentes a la expresión programada y al ensamblaje de anticuerpos, así como su papel en el desarrollo de las células B. Además, dicha estrategia podría proporcionar una fuente ideal para la producción de anticuerpos monoclonales (mAbs) completamente humanos - un hito importante para cumplir la promesa de la terapia con anticuerpos en enfermedades humanas. Se espera que los anticuerpos o las construcciones de anticuerpos completamente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a los mAbs de ratón o derivatizados de ratón y, por lo tanto, aumenten la eficacia y seguridad de las construcciones de anticuerpos/anticuerpos administradas. Se puede esperar que el uso de anticuerpos o construcciones de anticuerpos completamente humanos proporcione una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como inflamación, autoinmunidad y cáncer, que requieren administraciones repetidas de compuestos.

Un enfoque hacia este objetivo fue diseñar cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humana en previsión de que este tipo de ratones producirían un gran repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los grandes fragmentos de Ig humana preservarían la gran diversidad genética variable, así como la regulación adecuada de la producción y expresión de anticuerpos. Al explotar la maquinaria del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a las proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducidos en estas cepas de ratón debería producir anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluidos los antígenos humanos. Utilizando la tecnología de hibridomas, se podrían producir y seleccionar fácilmente mAbs humanos específicos para antígenos con la especificidad deseada. Esta estrategia general se demostró en relación con la generación de las primeras cepas de ratón XenoMouse (véase Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)). Las cepas de XenoMouse se modificaron con cromosomas artificiales de levadura (YACs) que contenían fragmentos de configuración de la línea germinal de un tamaño de 245 kb y 190 kb del locus de la cadena pesada humana y del locus de la cadena ligera kappa, respectivamente, que contenían secuencias de la región central variable y constante. Los YACs que contienen Ig humana demostraron ser compatibles con el sistema de ratón tanto para el reordenamiento como para la expresión de anticuerpos y eran capaces de sustituir los genes de Ig de ratón inactivados. Esto se demostró por su capacidad para inducir el desarrollo de células B, para producir un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos completamente humanos y para generar mAbs humanos específicos para antígenos. Estos resultados también sugirieron que la introducción de porciones más grandes de los loci de Ig humana que contienen un mayor número de genes V, elementos reguladores adicionales y regiones constantes de Ig humana podría recapitular sustancialmente el repertorio completo que es característico de la respuesta humoral humana a la infección y la inmunización. El trabajo de Green et al. se amplió recientemente a la introducción de más de aproximadamente el 80% del repertorio de anticuerpos humanos mediante la introducción de fragmentos YAC de configuración de línea germinal de tamaño megabase de los loci de cadena pesada humana y loci de cadena ligera kappa, respectivamente. Véase Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) y la solicitud de patente de EE.UU. Nº de Ser. 08/759.620.

La producción de los ratones XenoMouse se discute y describe adicionalmente en las solicitudes de patente de EE.UU. Nº de Ser. 07/466.008, Nº de Ser. 07/610.515, Nº de Ser. 07/919.297, Nº de Ser. 07/922.649, Nº de Ser. 08/031.801, Nº de Ser. 08/112.848, Nº de Ser. 08/234.145, Nº de Ser. 08/376.279, Nº de Ser. 08/430.938, Nº de Ser. 08/464.584, Nº de Ser. 08/464.582, Nº de Ser. 08/463.191, Nº de Ser. 08/462.837, Nº de Ser. 08/486.853, Nº de Ser. 08/486.857, Nº de Ser. 08/486.859, Nº de Ser. 08/462.513, Nº de Ser. 08/724.752 y Nº de Ser. 08/759.620; y las Pat. de EE.UU. Nºs 6.162.963; 6.150.584; 6.114.598; 6.075.181 y 5.939.598 y las Patentes japonesas Nºs 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2. Véase también Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) y Green y Jakobovits J. *Exp. Med.* 188:483-495 (1998), documentos EP 0 463 151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 y WO 03/47336.

En un enfoque alternativo, otros, incluido GenPharm International, Inc., han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, se imita un locus de Ig exógeno mediante la inclusión de trozos (genes individuales) del locus de Ig. Por lo tanto, uno o más genes VH, uno o más genes DH, uno o más genes JH, una región constante mu y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) se transforman en una construcción para la inserción en un animal. Este enfoque se describe en la Pat. de EE.UU. Nº 5.545.807 expedida a Surani *et al.* y las Pat. de EE.UU. Nºs 5.545.806; 5.625.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; 5.770.429; 5.789.650; 5.814.318; 5.877.397;

5.874.299; y 6.255.458 cada una expedida a Lonberg y Kay, Pat. de EE.UU. 5.591.669 y 6.023.010 expedida a Krimpenfort y Berns, Pat. de EE.UU. N° 5.612.205; 5.721.367; y 5.789.215 expedida a Berns et al., y la Pat. de EE.UU. N° 5.643.763 expedida a Choi y Dunn, y GenPharm International solicitud de patente de EE.UU. N° de Ser. 07/574.748, N° de Ser. 07/575.962, N° de Ser. 07/810.279, N° de Ser. 07/853.408, N° de Ser. 07/904.068, N° de Ser. 07/990.860, N° de Ser. 08/053.131, N° de Ser. 08/096.762, N° de Ser. 08/155.301, N° de Ser. 08/161.739, N° de Ser. 08/165.699, N° de Ser. 08/209.741. Véanse también los documentos EP 0 546 073 B1, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 y WO 98/24884 y la Pat de EE.UU. N° 5.981.175. Véase, además, Taylor *et al.* (1992), Chen *et al.* (1993), Tuaillon *et al.* (1993), Choi *et al.* (1993), Lonberg *et al.* (1994), Taylor *et al.* (1994) y Tuaillon *et al.* (1995), Fishwild *et al.* (1996).

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

Las respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) han conducido a la industria a preparar anticuerpos quiméricos o humanizados de otro modo. Sin embargo, se espera que se observen determinadas respuestas de anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA), particularmente en las utilizaciones crónicas o multidosis del anticuerpo. Por lo tanto, sería deseable proporcionar construcciones de anticuerpos que comprendan un dominio de unión completamente humano contra CDH3 y un dominio de unión completamente humano contra CD3 para viciar las preocupaciones y/o los efectos de la respuesta HAMA o HACA.

Las expresiones "(específicamente) se une a", "(específicamente) reconoce", "está (específicamente) dirigido a" y "(específicamente) reacciona con" significan de acuerdo con esta invención que un dominio de unión interactúa o interactúa específicamente con uno o más, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres y lo más preferiblemente al menos cuatro aminoácidos de un epítipo situado en la proteína o antígeno diana (CDH3/CD3), en donde la agrupación de epítipos de CDH3 humana está comprendida dentro de las posiciones de aminoácidos 291 - 363 (SEQ ID NO: 36) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1.

El término "epítipo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente un dominio de unión, tal como un anticuerpo o inmunoglobulina o derivado o fragmento de un anticuerpo o de una inmunoglobulina. Un "epítipo" es antigénico y, por lo tanto, al término epítipo se le alude a veces también en esta memoria como "estructura antigénica" o "determinante antigénico". Por lo tanto, el dominio de unión es un "sitio de interacción con el antígeno". También se entiende que dicha unión/interacción define un "reconocimiento específico".

"Epítipos" pueden formarse tanto por aminoácidos contiguos como por aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Un "epítipo lineal" es un epítipo en el que una secuencia primaria de aminoácidos comprende el epítipo reconocido. Un epítipo lineal incluye típicamente al menos 3 o al menos 4, y más habitualmente, al menos 5 o al menos 6 o al menos 7, por ejemplo, aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos en una secuencia única, y también puede ser más largo y comprenden al menos 15 o 20 aminoácidos, al menos 25 o 30 aminoácidos, o incluso más.

Un "epítipo conformacional", en contraposición a un epítipo lineal, es un epítipo en donde la secuencia principal de los aminoácidos que comprende el epítipo no es el único componente definitorio del epítipo reconocido (p. ej., un epítipo en donde la secuencia principal de aminoácidos no es necesariamente reconocida por el dominio de unión). Típicamente, un epítipo conformacional comprende un mayor número de aminoácidos con relación a un epítipo lineal. Con respecto al reconocimiento de epítipos conformacionales, el dominio de unión reconoce una estructura tridimensional del antígeno, preferiblemente un péptido o una proteína o un fragmento del mismo (en el contexto de la presente invención, el antígeno para uno de los dominios de unión está comprendido dentro de la proteína CDH3). Por ejemplo, cuando una molécula de proteína se pliega para formar una estructura tridimensional, determinados aminoácidos y/o la cadena principal polipeptídica que forma el epítipo conformacional se yuxtaponen, permitiendo que el anticuerpo reconozca el epítipo. Métodos para determinar la conformación de epítipos incluyen, pero no se limitan a, cristalografía de rayos X, espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional (2D-RMN) y espectroscopía de marcación de espín dirigida al sitio y resonancia paramagnética electrónica (EPR).

Los ejemplos proporcionados describen un método adicional para caracterizar un dominio de unión dado, que incluye un test de si el dominio de unión dado se une a uno o más epítipo(s) de una proteína dada, en particular CDH3.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "agrupación de epítipos" designa epítipos que se encuentran en un tramo contiguo definido de un antígeno, es decir, la agrupación de epítipos de CDH3 humano está comprendida dentro de las posiciones de aminoácidos 291-363 (SEQ ID NO: 36) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1. Una agrupación de epítipos puede comprender uno, dos o más epítipos. Una construcción de anticuerpo también puede unirse a un epítipo dentro de una agrupación de epítipos y, además, a un epítipo adicional fuera de esta agrupación, que podría corresponder entonces a un epítipo discontinuo. Un epítipo discontinuo se caracteriza

habitualmente porque abarca tramos de aminoácidos del antígeno que no son contiguos. Por ejemplo, una construcción de anticuerpo podría unirse a los subdominios extracelulares D3A y D3C, pero no a D3B. El concepto de "agrupación de epítomos" también se utiliza en la caracterización de las características de las construcciones de anticuerpos de la invención. Las agrupaciones de epítomos y los epítomos que se definieron - en el contexto de la presente invención - en el dominio extracelular de CDH3 están comprendidos dentro de las posiciones de aminoácidos 291-363 (SEQ ID NO: 36) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1 como se describe arriba y se representa en la Figura 1.

Cuando un dominio extracelular (D1-D5) o un sub-dominio (A, B, C) del mismo en la proteína CDH3 humana se intercambia con el respectivo dominio extracelular (D1-D5) o un sub-dominio (A, B, C) del mismo de un antígeno CDH3 no humano y no primate (p. ej., de pollo o ratón) (que da como resultado una construcción que comprende CDH3 humana, en donde un dominio extracelular humano o sub-dominio del mismo se reemplaza por su dominio o sub-dominio extracelular no humano homólogo del mismo), se producirá una disminución en la unión del dominio de unión. Dicha disminución es preferiblemente de al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %; más preferiblemente de al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso 100 % en comparación con la agrupación de epítomos respectiva en la proteína CDH3 humana, por lo que la unión al dominio extracelular respectivo (D1-D5) o sub-dominio del mismo en la proteína CDH3 humana se establece en 100 %. Se prevé que las quimeras CDH3 humana/CDH3 no humana mencionadas anteriormente se expresen en células CHO. También se prevé que las quimeras CDH3 humana/CDH3 no humana se fusionen con un dominio transmembrana y/o un dominio citoplásmico de una proteína unida a la membrana diferente tal como EpCAM.

Un método para testar esta pérdida de unión debido al intercambio con el respectivo dominio extracelular (D1-D5) o sub-dominio del mismo de un antígeno CDH3 no humano (p. ej., de ratón, pero otros tales como de rata, hámster, conejo, pollo, etc. también podrían ser concebibles) se describe en el Ejemplo 2. Un método adicional para determinar la contribución de un residuo específico de un antígeno diana al reconocimiento por una construcción de anticuerpo o dominio de unión es el escaneo de alanina (véase, p. ej., Morrison KL y Weiss GA. *Cur Opin Chem Biol.* junio de 2001;5(3):302-7), en que cada uno de los residuos a analizar se reemplaza por alanina, p. ej. mediante mutagénesis dirigida al sitio. La alanina se utiliza debido a su grupo funcional metilo no voluminoso y químicamente inerte que, no obstante, imita las referencias de estructura secundaria que poseen muchos de los otros aminoácidos. A veces, se pueden utilizar aminoácidos voluminosos, tales como valina o leucina, en los casos en los que se desee la conservación del tamaño de los residuos mutados. El escaneo de alanina es una tecnología madura que ha sido utilizada durante un largo período de tiempo.

La interacción entre el dominio de unión y el epítomo o la agrupación de epítomos implica que un dominio de unión exhiba una afinidad apreciable por el epítomo o la agrupación de epítomos en una proteína o antígeno particular (aquí: CDH3 y CD3, respectivamente) y, en general, no exhiba una reactividad significativa con proteínas o antígenos distintos de CDH3 o CD3. "Afinidad apreciable" incluye la unión con una afinidad de aproximadamente 10^{-6} M (KD) o mayor. Preferiblemente, la unión se considera específica cuando la afinidad de unión es de aproximadamente 10^{-12} a 10^{-8} M, 10^{-12} a 10^{-9} M, 10^{-12} a 10^{-10} M, 10^{-11} a 10^{-8} M, preferiblemente de aproximadamente 10^{-11} a 10^{-9} M. El que un dominio de unión reaccione específicamente o se una a una diana se puede testar fácilmente, *inter alia*, comparando la reacción de dicho dominio de unión con una proteína o antígeno diana con la reacción de dicho dominio de unión con proteínas o antígenos distintos de CDH3 o CD3. Preferiblemente, un dominio de unión de la invención no se une esencial o sustancialmente a proteínas o antígenos distintos de CDH3 o CD3 (*es decir*, el primer dominio de unión no es capaz de unirse a proteínas distintas de CDH3 y el segundo dominio de unión no es capaz de unión a proteínas distintas de CD3).

La expresión "no se une esencialmente / sustancialmente" o "no es capaz de unirse" significa que un dominio de unión de la presente invención no se une a una proteína o antígeno que no sea CDH3 o CD3, *es decir*, no muestra una reactividad de más de 30 %, preferiblemente no más de 20 %, más preferiblemente no más de 10 %, de manera particularmente preferida no más de 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % con proteínas o antígenos distintos de CDH3 o CD3, en donde la unión a CDH3 o CD3, respectivamente, se establece en 100 %.

Se cree que la unión específica se efectúa mediante motivos específicos en la secuencia de aminoácidos del dominio de unión y el antígeno. Por lo tanto, la unión se consigue como resultado de su estructura primaria, secundaria y/o terciaria, así como como resultado de modificaciones secundarias de dichas estructuras. La interacción específica del sitio de interacción del antígeno con su antígeno específico puede resultar en una simple unión de dicho sitio al antígeno. Además, la interacción específica del sitio de interacción del antígeno con su antígeno específico puede, alternativa o adicionalmente, dar como resultado el inicio de una señal, p. ej., debido a la inducción de un cambio de conformación del antígeno, una oligomerización del antígeno, etc.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico que comprende un primer dominio de unión humano que se une a CDH3 humana y de macaco en la superficie de una célula diana y un segundo dominio de unión que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T, en donde el primer dominio de unión comprende una región VH que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y una región VL que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 seleccionada del grupo que consiste en:

a) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 149, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 150, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 151, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 152, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 153 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 154;

b) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 159, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 160, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 161, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 162, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 163 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 164;

c) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 169, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 170, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 171, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 172, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 173 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 174;

d) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 179, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 180, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 181, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 182, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 183 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 184;

e) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 189, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 190, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 191, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 192, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 193 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 194;

f) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 199, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 200, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 201, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 202, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 203 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 204;

g) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 209, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 210, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 211, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 212, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 213 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 214;

h) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 219, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 220, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 221, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 222, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 223 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 224;

i) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 229, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 230, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 231, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 232, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 233 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 234; y

j) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 239, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 240, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 241, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 242, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 243 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 244.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico que comprende un primer dominio de unión humano que se une a CDH3 humana y de macaco en la superficie de una célula diana y un segundo dominio de unión que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T, en donde el primer dominio de unión comprende una región VH que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y una región VL que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 seleccionada del grupo que consiste en:

a) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 279, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 280, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 281, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 282, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 283 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 284;

b) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 289, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 290, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 291, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 292, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 293 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 294;

c) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 299, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 300, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 301, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 302, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 303 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 304;

d) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 309, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 310, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 311, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 312, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 313 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 314;

e) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 319, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 320, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 321, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 322, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 323 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 324;

f) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 329, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 330, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 331, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 332, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 333 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 334;

5 g) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 339, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 340, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 341, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 342, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 343 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 344; y

10 h) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 349, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 350, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 351, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 352, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 353 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 354.

El término "variable" se refiere a las porciones de los dominios de anticuerpo o de inmunoglobulina que exhiben variabilidad en su secuencia y que están implicadas en la determinación de la especificidad y afinidad de unión de un anticuerpo particular (es decir, el "dominio o dominios variables"). El emparejamiento de una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL) juntas forma un único sitio de unión al antígeno. El dominio CH más próximo a VH se designa CH1. Cada una de las cadenas ligeras (L) está enlazada a una cadena pesada (H) por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están enlazadas entre sí por uno o más enlaces disulfuro de acuerdo con el isotipo de la cadena H.

La variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos; se concentra en sub-dominios de cada una de las regiones variables de la cadena pesada y ligera. Estos sub-dominios se denominan "regiones hipervariables" o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDRs). Las porciones más conservadas (es decir, no hipervariables) de los dominios variables se denominan regiones "marco" (FRM o FR) y proporcionan un armazón para las seis CDRs en el espacio tridimensional para formar una superficie de unión al antígeno. Los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas que se producen de forma natural comprenden cada uno cuatro regiones FRM (FR1, FR2, FR3 y FR4), que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de la lámina β . Las regiones hipervariables en cada una de las cadenas se mantienen juntas en estrecha proximidad por el FRM y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno (véase Kabat *et al.*, *loc. cit.*). Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión al antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos y activación del complemento.

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

Los límites y las longitudes de la definición exacta de CDR están sujetos a diferentes sistemas de clasificación y numeración. Por lo tanto, Kabat, Chothia, contacto o cualquier otra definición de límites pueden hacer referencia a las CDRs, incluyendo el sistema de numeración descrito en esta memoria. A pesar de los diferentes límites, cada uno de estos sistemas tiene cierto grado de solapamiento en lo que constituye las denominadas "regiones hipervariables" dentro de las secuencias variables. Por tanto, las definiciones de CDR de acuerdo con estos sistemas pueden diferir en longitud y áreas límites con respecto a la región de marco adyacente. Véase, por ejemplo, Kabat (un enfoque basado en la variabilidad de secuencia entre especies), Chothia (un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo) y/o MacCallum (Kabat *et al.*, *loc. cit.*; Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901-917; y MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol., 1996, 262: 732). Aún otro patrón más para caracterizar el sitio de unión al antígeno es la definición de AbM utilizada por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Véase, *p. ej.*, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. En: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). En la medida en que dos técnicas de identificación de residuos definan regiones de solapamiento, pero no regiones idénticas, se pueden combinar para definir una CDR híbrida. Sin embargo, se prefiere la numeración de acuerdo con el denominado sistema Kabat.

Típicamente, las CDRs forman una estructura de bucle que se puede clasificar como estructura canónica. La expresión "estructura canónica" se refiere a la conformación de la cadena principal que es adoptada por los bucles de unión a antígeno (CDR). A partir de estudios estructurales comparativos, se ha descubierto que cinco de los seis bucles de unión a antígeno tienen solo un repertorio limitado de conformaciones disponibles. Cada una de las estructuras canónicas puede caracterizarse por los ángulos de torsión de la cadena principal polipeptídica. Los bucles correspondientes entre anticuerpos pueden, por lo tanto, tener estructuras tridimensionales muy similares, a pesar de la alta variabilidad de la secuencia de aminoácidos en la mayor parte de los bucles (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; Chothia *et al.*, Nature, 1989, 342: 877; Martin y Thornton, J. Mol. Biol., 1996, 263: 800). Además, existe una relación entre la estructura de bucle adoptada y las secuencias de aminoácidos que la rodean. La conformación de una clase canónica particular está determinada por la longitud del bucle y los residuos de aminoácidos que residen en

posiciones clave dentro del bucle, así como dentro del marco conservado (*es decir*, fuera del bucle). Por lo tanto, la asignación a una clase canónica particular se puede realizar en función de la presencia de estos residuos de aminoácidos clave.

La expresión "estructura canónica" también puede incluir consideraciones en cuanto a la secuencia lineal del anticuerpo, por ejemplo, según se cataloga por Kabat (Kabat *et al.*, loc. cit.). El esquema (sistema) de numeración de Kabat es un patrón ampliamente adoptado para numerar los residuos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo de una manera consistente y es el esquema preferido aplicado en la presente invención como también se menciona en otra parte de esta memoria. También se pueden utilizar consideraciones estructurales adicionales para determinar la estructura canónica de un anticuerpo. Por ejemplo, aquellas diferencias que no se reflejan completamente en la numeración de Kabat pueden describirse mediante el sistema de numeración de Chothia *et al.* y/o revelarse por otras técnicas, por ejemplo, cristalografía y modelado computacional bidimensional o tridimensional. Por consiguiente, una secuencia de anticuerpo dada puede colocarse en una clase canónica que permite, entre otras cosas, identificar secuencias de chasis apropiadas (p. ej., en base al deseo de incluir una diversidad de estructuras canónicas en una colección). La numeración de Kabat de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo y consideraciones estructurales según se describen por Chothia *et al.*, loc. cit. y sus implicaciones para la construcción de aspectos canónicos de la estructura del anticuerpo, se describen en la bibliografía. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas en la técnica. Para una revisión de la estructura del anticuerpo, véase Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988.

La CDR3 de la cadena ligera y, en particular, la CDR3 de la cadena pesada pueden constituir los determinantes más importantes en la unión del antígeno dentro de las regiones variables de la cadena ligera y pesada. En algunas construcciones de anticuerpos, la CDR3 de la cadena pesada parece constituir el área principal de contacto entre el antígeno y el anticuerpo. Pueden utilizarse esquemas de selección *in vitro* en los que se varía CDR3 solo para variar las propiedades de unión de un anticuerpo o determinar qué residuos contribuyen a la unión de un antígeno. Por lo tanto, la CDR3 es típicamente la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión del anticuerpo. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como dos residuos de aminoácidos o más de 26 aminoácidos.

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

En una realización, el primer dominio de unión de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención comprende una región VH seleccionada del grupo que consiste en regiones VH como se representa en SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 235, y SEQ ID NO: 245.

En una realización adicional de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención, el primer dominio de unión comprende una región VL seleccionada del grupo que consiste en regiones VL como se representa en SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 236, y SEQ ID NO: 246.

En otra realización adicional de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención, el primer dominio de unión comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en pares de una región VH y una región VL como se representa en SEQ ID NO: 155+156, SEQ ID NO: 165+166, SEQ ID NO: 175+176, SEQ ID NO: 185+186, SEQ ID NO: 195+196, SEQ ID NO: 205+206, SEQ ID NO: 215+216, SEQ ID NO: 225+226, SEQ ID NO: 235+236 y SEQ ID NO: 245+246.

En otra realización, el primer dominio de unión de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención comprende una región VH seleccionada del grupo que consiste en regiones VH como se representa en SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 315, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 335, SEQ ID NO: 345, y SEQ ID NO: 355.

En una realización adicional de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención, el primer dominio de unión comprende una región VL seleccionada del grupo que consiste en regiones VL como se representa en SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 306, SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 336, SEQ ID NO: 346, y SEQ ID NO: 356.

En otra realización adicional de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención, el primer dominio de unión comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en pares de una región VH y una región VL como se representa en SEQ ID NO: 285+286, SEQ ID NO: 295+296, SEQ ID NO: 305+306, SEQ ID NO: 315+316, SEQ ID NO: 325+326, SEQ ID NO: 335+336, SEQ ID NO: 345+346 y SEQ ID NO: 355+356.

El término "biespecífico", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una construcción de anticuerpo que es "al menos biespecífica", *es decir*, comprende al menos un primer dominio de unión y un segundo dominio de unión, en donde el primer dominio de unión se une a un antígeno o diana (aquí: CDH3), y el segundo dominio de unión se une a otro antígeno o diana (aquí: CD3). Por consiguiente, las construcciones de anticuerpos de acuerdo con la invención comprenden especificidades para al menos dos antígenos o dianas diferentes. La expresión "construcción de anticuerpos biespecíficos" de la invención también abarca construcciones de anticuerpos multiespecíficos, tales como construcciones de anticuerpos triespecíficos, las últimas incluyen tres dominios de unión, o construcciones que tienen más de tres (por ejemplo, cuatro, cinco...) especificidades.

Dado que las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de acuerdo con la invención son (al menos) biespecíficas, no se producen de forma natural y son marcadamente diferentes de los productos que se producen de forma natural. Una construcción de anticuerpo o inmunoglobulina "biespecífico" es, por lo tanto, un anticuerpo híbrido artificial o inmunoglobulina que tiene al menos dos sitios de unión distintos con diferentes especificidades. Anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una diversidad de métodos que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, *p. ej.*, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990).

Los al menos dos dominios de unión y los dominios variables de la construcción de anticuerpo de la presente invención pueden comprender o no enlazadores peptídicos (péptidos espaciadores). La expresión "enlazador de péptidos" define de acuerdo con la presente invención una secuencia de aminoácidos mediante la cual las secuencias de aminoácidos de un dominio (variable y/o de unión) y otro dominio (variable y/o de unión) de la construcción de anticuerpo de la invención están enlazados entre sí. Una característica técnica esencial de un enlazador peptídico de este tipo es que no comprende actividad de polimerización alguna. Entre los enlazadores peptídicos adecuados se encuentran los descritos en las Patentes de EE.UU. 4.751.180 y 4.935.233 o el documento WO 88/09344.

En el caso de que se utilice un enlazador, este enlazador es preferiblemente de una longitud y secuencia suficientes para asegurar que cada uno de los dominios primero y segundo puedan, independientemente uno de otro, conservar sus especificidades de unión diferenciales. Para los enlazadores peptídicos que conectan los al menos dos dominios de unión en la construcción de anticuerpos de la invención (o dos dominios variables), se prefieren aquellos enlazadores peptídicos que comprenden solo un pequeño número de residuos de aminoácidos, *p. ej.*, 12 residuos de aminoácidos o menos. Por lo tanto, se prefieren los enlazadores peptídicos de 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 residuos de aminoácidos. Un enlazador peptídico contemplado con menos de 5 aminoácidos comprende 4, 3, 2 o uno o más aminoácidos, en donde se prefieren enlazadores ricos en Gly. Un aminoácido "único" particularmente preferido en el contexto de dicho "enlazador peptídico" es Gly. Por consiguiente, dicho enlazador peptídico puede consistir en un solo aminoácido Gly. Otra realización preferida de un enlazador peptídico se caracteriza por la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, es decir, Gly₄Ser (SEQ ID NO: 393), o sus polímeros, es decir, (Gly₄Ser)_x, en que x es un número entero de 1 o mayor. Las características de dicho enlazador peptídico, que comprenden la ausencia de la promoción de estructuras secundarias, son conocidas en la técnica y se describen, *p. ej.*, en Dall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) y Raag y Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Se prefieren los enlazadores peptídicos que tampoco fomentan estructuras secundarias algunas. El enlace de dichos dominios entre sí puede proporcionarse, *p. ej.* mediante ingeniería genética, como se describe en los ejemplos. Métodos para preparar construcciones de cadena sencilla biespecíficas condensadas y enlazadas operativamente y expresarlas en células de mamífero o bacterias son bien conocidos en la técnica (*p. Ej.*, el documento WO 99/54440 o Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001).

Por tanto, la invención proporciona una construcción de anticuerpo que está en un formato de un scFv. La expresión "está en un formato" no excluye que la construcción pueda modificarse adicionalmente, *p. ej.* mediante unión o fusión con otros restos, tal como se describe en esta memoria.

La construcción de anticuerpo de la invención es una "construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico" en el formato de un "Fv de cadena sencilla" (scFv). Aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse mediante métodos recombinantes mediante un enlazador sintético que les permite formar una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar una molécula monovalente; véase, *p. ej.*, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y la función de los fragmentos se evalúa de la misma manera que los anticuerpos completos o de longitud completa. Un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) es, por lo tanto, una proteína de fusión de la región variable de la cadena pesada (VH) y de la cadena ligera (VL) de inmunoglobulinas, habitualmente conectada con un péptido enlazador corto de aproximadamente diez a aproximadamente 25 aminoácidos, preferiblemente aproximadamente 15 a 20 aminoácidos.

El enlazador es habitualmente rico en glicina para la flexibilidad, así como en serina o treonina para la solubilidad, y puede conectar el extremo N de la VH con el extremo C de la VL, o *viceversa*. Esta proteína conserva la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del enlazador.

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

Los fragmentos variables de cadena sencillas bivalentes (también denominadas divalentes) o biespecíficas (bi-scFvs o di-scFvs que tienen el formato (scFv)₂ pueden modificarse mediante el enlace de dos moléculas scFv. Si estas moléculas de scFv tienen la misma especificidad de unión, la molécula de (scFv)₂ resultante se denominará preferiblemente bivalente (*es decir*, tiene dos valencias para el mismo epítipo diana). Si las dos moléculas de scFv tienen diferentes especificidades de unión, la molécula de (scFv)₂ resultante se denominará preferiblemente biespecífica. El enlace se puede realizar produciendo una sola cadena peptídica con dos regiones VH y dos regiones VL, produciendo scFv en tándem (véase, *p. ej.*, Kufer P. et al., (2004) Trends in Biotechnology 22(5):238-244). Otra posibilidad es la creación de moléculas scFv con péptidos enlazadores que son demasiado cortos como para que las dos regiones variables se plieguen (*p. ej.*, aproximadamente cinco aminoácidos), lo que obliga a los scFv a dimerizarse. Este tipo se conoce como diacuerpos (véase *p. ej.*, Hollinger, Philipp et al., (julio de 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8.).

De acuerdo con una realización adicional de la construcción de anticuerpos de la invención, la cadena pesada (VH) y la cadena ligera (VL) de un dominio de unión (que se une al antígeno diana CDH3 o a CD3) no están conectadas directamente a través de un enlazador peptídico como se describe arriba, sino que los dominios de unión se forman como se describe para el diacuerpo. Por lo tanto, la VH del dominio de unión de CD3 puede fusionarse con la VL del dominio de unión de CDH3 mediante un enlazador peptídico, y la VH del dominio de unión de CDH3 se fusiona con la VL del dominio de unión de CD3 mediante un enlazador peptídico de este tipo.

Como un aspecto de la presente divulgación y solo con fines ilustrativos, los anticuerpos de dominio único comprenden simplemente un dominio variable de anticuerpo (monomérico) que es capaz de unirse selectivamente a un antígeno específico, independientemente de otras regiones o dominios V. Los primeros anticuerpos de dominio único se modificaron a partir de anticuerpos de cadena pesada que se encuentran en los camélidos, y a estos se les denomina fragmentos V_HH. Los peces cartilaginosos también tienen anticuerpos de cadena pesada (IgNAR), a partir de los cuales se pueden obtener anticuerpos de dominio único denominados fragmentos V_{NAR}. Un enfoque alternativo es dividir los dominios variables diméricos de las inmunoglobulinas comunes, *p. ej.*, de seres humanos o roedores en monómeros, obteniendo así VH o VL como un solo dominio Ab. Aunque la mayoría de las investigaciones sobre anticuerpos de dominio único se basan actualmente en dominios variables de cadena pesada, también se ha demostrado que los nanocuerpos derivados de cadenas ligeras se unen específicamente a epítopos diana. Ejemplos de anticuerpos de dominio único se denominan sdAb, nanocuerpos o anticuerpos de dominio variable único.

Como un aspecto de la presente divulgación y solo con fines ilustrativos, un (mAb de dominio único)₂ es, por lo tanto, una construcción de anticuerpo monoclonal compuesta por (al menos) dos anticuerpos monoclonales de dominio único, que se seleccionan individualmente del grupo que comprende VH, VL, V_HH y V_{NAR}. El enlazador está preferiblemente en forma de un enlazador peptídico. De forma similar, un "mAb de dominio único scFv" es una construcción de anticuerpo monoclonal compuesto por al menos un anticuerpo de dominio único como se describe arriba y una molécula de scFv como se describe arriba. De nuevo, el enlazador está preferiblemente en forma de un enlazador peptídico.

En una realización, el primer dominio de unión humano comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias representadas en SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 237, y SEQ ID NO: 247.

En otra realización, el primer dominio de unión humano comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias representadas en SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 347, y SEQ ID NO: 357.

También se prevé que la construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla de la invención tenga, además de su función para unirse a las moléculas diana CDH3 y CD3, una función adicional. En este formato, la construcción de anticuerpos es una construcción de anticuerpos trifuncional o multifuncional que se fija como objetivo a las células diana mediante la unión a CDH3, mediando en la actividad de las células T citotóxicas a través de la unión de CD3 y proporcionando una función adicional, tal como un dominio constante Fc completamente funcional que media en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, a través del reclutamiento de células efectoras tales como las células

NK, un marcador (fluorescente, etc.), un agente terapéutico tal como una toxina o un radionucleido, y/o medios para potenciar la semivida en suero, etc.

Ejemplos de medios para prolongar la semivida en suero de las construcciones de anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla de la invención incluyen péptidos, proteínas o dominios de proteínas, que se condensan o se unen de otro modo a las construcciones de anticuerpos. El grupo de péptidos, proteínas o dominios de proteínas incluye péptidos que se unen a otras proteínas con un perfil farmacocinético preferido en el cuerpo humano, tal como la albúmina sérica (véase el documento WO 2009/127691). Un ejemplo de estos se representa en SEQ ID NO: 437. Un concepto alternativo de péptidos que prolongan la semivida (HLE) de este tipo incluye péptidos que se unen al receptor Fc neonatal (FcRn, véase el documento WO 2007/098420), que también se utilizan en algunas de las construcciones de la presente invención. El concepto de unir dominios más grandes de proteínas o proteínas completas incluye, *p. ej.*, la fusión de albúmina de suero humano, variantes o mutantes de albúmina de suero humano (véanse los documentos WO 2011/051489, WO 2012/059486, WO 2012/150319, WO 2013/135896, WO 2014/072481, WO 2013/075066) o dominios de los mismos, así como la fusión de la región constante de inmunoglobulinas (dominios Fc) y variantes de las mismas. Variantes de este tipo de dominios Fc pueden optimizarse/modificarse con el fin de permitir el emparejamiento deseado de dímeros o multímeros, para suprimir la unión al receptor Fc (*p. ej.*, el receptor Fcγ) o por otras razones. Si las moléculas de HLE arriba descritas están compuestas por una sola cadena polipeptídica, tienen la ventaja de que (i) no hay necesidad de dos sistemas de expresión separados y (ii) pueden aislarse con un alto grado de pureza, debido a la ausencia de una "cadena ficticia". Un concepto adicional conocido en la técnica para prolongar la semivida de pequeños compuestos proteicos en el cuerpo humano es la pegilación de esos compuestos, tales como la construcción de anticuerpos de la presente invención.

En una realización preferida, las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de acuerdo con la invención se pueden enlazar (*p. ej.*, a través de un enlace peptídico) con un participante en la fusión (tal como una proteína, un polipéptido o un péptido), *p. ej.*, con el fin de prolongar la semivida en suero de la construcción. Estos participantes en la fusión pueden seleccionarse de albúmina de suero humano ("HSA" o "HALB") así como variantes de secuencia de los mismos, péptidos que se unen a HSA, péptidos que se unen a FcRn ("FcRn BP") o construcciones que comprenden una región Fc (derivada de anticuerpo). Secuencias ejemplares de estos participantes en la fusión se representan en SEQ ID NOs: 406-421 y 437-444. En general, los participantes en la fusión pueden enlazarse al extremo N o al extremo C de las construcciones de anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención, ya sea directamente (*p. ej.*, a través de un enlace peptídico) o a través de un enlazador peptídico tal como (GGGS)_n (en donde "n" es un número entero de 2 o mayor, *p. ej.*, 2 o 3 o 4). Enlazadores peptídicos adecuados se representan en las SEQ ID NOs: 392-400.

La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico denominada CDH3-13 (secuencia de longitud completa de la molécula biespecífica representada en SEQ ID NO: 178) se enlazó en marco con una selección de proteínas de fusión o péptidos de fusión (véase, *p. ej.*, SEQ ID NOs: 437-444) con el fin de prolongar la semivida en suero de la construcción. Las secuencias respectivas de estas construcciones de fusión se describen en SEQ ID NOs: 379-389. Las secuencias de estos participantes en la fusión de la construcción de anticuerpo biespecífico "desnudo" también pueden enlazarse (en el extremo C o N, en la forma que corresponde y se muestra para CDH3-13) a cualquier otra construcción de anticuerpo descrita en esta memoria.

Por lo tanto, se prevé que la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención comprenda, además, un polipéptido como se representa en SEQ ID NO: 437 o una albúmina, preferiblemente una albúmina humana o una variante de la misma (que tiene propiedades mejoradas tales como afinidades por el receptor FcRn y semivida plasmática prolongada), lo más preferiblemente una albúmina como se representa en SEQ ID NO: 443 o 444. Estos restos se condensan preferiblemente en marco con el extremo C de la construcción de anticuerpo biespecífico.

El Ejemplo 15 muestra, además, una ventaja inesperada que implica la fusión C-terminal de una albúmina con una construcción de anticuerpo biespecífico de la invención. Para aquellas moléculas de unión a células T biespecíficas que comprenden un dominio de unión específico para la cadena CD3ε humana y de *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* o *Saimiri sciureus*, en donde el epítipo es parte de una secuencia de aminoácidos comprendida en el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 u 8 del documento WO 2008/119567 y comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu, se observó que esas moléculas - cuando se utilizan en concentraciones muy altas - mostraron citotoxicidad de células T incluso en la ausencia de células diana. Problemas de alta concentración de este tipo pueden volverse relevantes para vías de administración específicas o en combinación con configuraciones de dianas específicas y concentraciones de compuestos requeridas. Ejemplos preferidos de segundos dominios de unión de este tipo que se unen a CD3 humana en la superficie de una célula T se describen más adelante en esta memoria y se representan en SEQ ID NOs: 445-537.

Cuando una albúmina sérica se condensa con el extremo C de una construcción biespecífica de este tipo, se evita la citotoxicidad de las células T, véase la Figura 13. Sin la intención de limitarse por la teoría, la activación de células T en presencia de una alta concentración de construcciones de anticuerpos biespecíficos que se acoplan a las células T, y en ausencia de células diana, puede explicarse por la dimerización o multimerización de las construcciones de anticuerpos a través del dominio de unión a CD3. Una dimerización o multimerización de este tipo está estéricamente

alterada por la fusión de una albúmina o una variante de la misma al extremo C de la construcción de anticuerpo, al tiempo que se mantienen las características de la construcción del anticuerpo para su modo de acción de acoplamiento a las células T.

5 Por lo tanto, una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con la presente invención comprende en un orden N- a C-terminal:

- 10 • el primer dominio de unión que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 347, y SEQ ID NO: 357;
- 15 • un enlazador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 392-400;
- el segundo dominio de unión que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 453, SEQ ID NO: 462, SEQ ID NO: 471, SEQ ID NO: 480, SEQ ID NO: 489, SEQ ID NO: 498, SEQ ID NO: 507, SEQ ID NO: 516, SEQ ID NO: 525, SEQ ID NO: 534, y SEQ ID NO: 537; y
- 20 • un enlazador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 392-400; y
- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 437, 443 y 444.

25 De acuerdo con otra realización, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención comprende (además de los dos dominios de unión) un tercer dominio que comprende dos monómeros polipeptídicos, cada uno de los cuales comprende un dominio bisagra, uno CH2 y uno CH3, en donde dichos dos polipéptidos (o monómeros polipeptídicos) se condensan entre sí a través de un enlazador peptídico. Preferiblemente, dicho tercer dominio comprende en un orden N- a C-terminal: bisagra-CH2-CH3-enlazador-bisagra-CH2-CH3. Las secuencias de aminoácidos preferidas para dicho tercer dominio se representan en las SEQ ID NOS: 414-421. Cada uno de dichos monómeros polipeptídicos tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID Nos: 406-413, o que es al menos un 90% idéntica a esas secuencias. En otra realización preferida, los dominios de unión primero y segundo de la construcción de anticuerpo biespecífico de la invención se condensan con el tercer dominio a través de un enlazador peptídico que, por ejemplo, se selecciona del grupo que consiste en una cualquiera de SEQ ID NOS: 392-400, preferiblemente del grupo que consiste en un a cualquiera de las SEQ ID NOS: 392, 393, 395, 396, 397, 399 y 400.

40 En línea con la presente invención, una "bisagra" es una región bisagra de IgG. Esta región se puede identificar por analogía utilizando la numeración de Kabat, véanse las posiciones 223-243 de Kabat. En línea con lo anterior, el requisito mínimo para una "bisagra" son los residuos de aminoácidos correspondientes al tramo de secuencia de IgG1 de D231 a P243 de acuerdo con la numeración de Kabat. Los términos CH2 y CH3 se refieren a las regiones constantes 2 y 3 de la cadena pesada de inmunoglobulina. Estas regiones también pueden identificarse por analogía utilizando la numeración de Kabat, véanse las posiciones de Kabat 244-360 para CH2 y las posiciones de Kabat 361-478 para CH3. Se entiende que existe alguna variación entre las inmunoglobulinas en términos de su región Fc de IgG1, región Fc de IgG2, región Fc de IgG3, región Fc de IgG4, región Fc de IgM, región Fc de IgA, región Fc de IgD y región Fc de IgE (véase, p. ej., Padlan, Molecular Immunology, 31(3), 169-217 (1993)). La expresión monómero Fc se refiere a las dos últimas regiones constantes de la cadena pesada de IgA, IgD e IgG, y a las últimas tres regiones constantes de la cadena pesada de IgE e IgM. El monómero Fc también puede incluir la bisagra N-terminal flexible con respecto a estos dominios. Para IgA e IgM, el monómero Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, la porción Fc comprende los dominios de inmunoglobulina CH2 y CH3 y la bisagra entre los dos primeros dominios y CH2. Aunque los límites de la porción Fc de una inmunoglobulina pueden variar, un ejemplo para una porción Fc de cadena pesada de IgG humana que comprende un dominio bisagra funcional, CH2 y CH3 puede definirse, p. ej., que comprende los residuos D231 (del dominio bisagra) a P476 (del extremo C del dominio CH3), o D231 a L476, respectivamente, para IgG4, en donde la numeración está de acuerdo con Kabat.

Por lo tanto, la construcción de anticuerpos de la invención puede comprender en un orden N- a C-terminal:

- 60 (a) el primer dominio de unión;
- (b) un enlazador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 393, 399 y 400;
- 65 (c) el segundo dominio de unión;

(d) un enlazador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 392, 393, 395, 396, 397, 399 y 400;

5 (e) el primer monómero polipeptídico del tercer dominio (que comprende una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3);

(f) un enlazador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 402, 403, 404 y 405; y

10 (g) el primer monómero polipeptídico del tercer dominio (que comprende una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3).

También se prefiere que la construcción de anticuerpo de la invención comprenda en un orden N- a C-terminal:

15 (a) el primer dominio de unión que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 347, y SEQ ID NO: 357;

20 (b) un enlazador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 393, 399 y 400;

25 (c) el segundo dominio de unión que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 453, SEQ ID NO: 462, SEQ ID NO: 471, SEQ ID NO: 480, SEQ ID NO: 489, SEQ ID NO: 498, SEQ ID NO: 507, SEQ ID NO: 516, SEQ ID NO: 525, SEQ ID NO: 534, y SEQ ID NO: 537;

(d) un enlazador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 392, 393, 395, 396, 397, 399 y 400; y

30 (e) el tercer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 414-421.

35 Por lo tanto, en una realización preferida, la construcción de anticuerpo de la presente invención comprende o consiste en un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los representados en SEQ ID NO: 422, SEQ ID NO: 423, SEQ ID NO: 424, SEQ ID NO: 425, SEQ ID NO: 426, SEQ ID NO: 427, SEQ ID NO: 428, SEQ ID NO: 429, SEQ ID NO: 430, SEQ ID NO: 431, SEQ ID NO: 432, SEQ ID NO: 433, SEQ ID NO: 434, y SEQ ID NO: 435.

También se hace referencia al Ejemplo 15 que muestra una de las construcciones Fc arriba descritas y su actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto de ratón.

40 Modificaciones covalentes de las construcciones de anticuerpos también se incluyen dentro del alcance de esta invención y, en general, pero no siempre, se realizan de forma postraducciona. Por ejemplo, varios tipos de modificaciones covalentes de la construcción de anticuerpo se introducen en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos específicos de la construcción de anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales.

45 Los residuos de cisteinilo se hacen reaccionar más comúnmente con α -haloacetatos (y aminos correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Residuos de cisteinilo también se derivatizan por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, 2-piridil disulfuro de metilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

50 Residuos de histidilo se derivatizan por reacción con pirocarbonato de dietilo a pH 5,5-7,0, ya que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. También es útil bromuro de parabromofenacilo; la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0. Residuos lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídridos succínicos u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción catalizada por transaminasas con glioxilato.

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

65

La modificación específica de residuos de tirosilo se puede realizar, con particular interés, en la introducción de marcadores espectrales en residuos de tirosilo mediante reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Más comúnmente, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Residuos de tirosilo se yodan utilizando ¹²⁵I o ¹³¹I para preparar proteínas marcadas para uso en radioinmunoensayo, siendo adecuado el método de cloramina T arriba descrito.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidias (R'-N=C=N-R'), en que R y R' son grupos alquilo opcionalmente diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo se convierten en residuos de asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.

La derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular las construcciones de anticuerpos de la presente invención con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para uso en una diversidad de métodos. Agentes de reticulación comúnmente utilizados incluyen, *p. ej.*, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo los ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes derivatizantes tales como 3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato de metilo producen compuestos intermedios fotoactivables que son capaces de formar reticulaciones en presencia de luz. Alternativamente, las matrices reactivas insolubles en agua, tales como hidratos de carbono activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos como se describe en las Pat. de EE.UU. N°s 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 se emplean para la inmovilización de proteínas.

Residuos de glutaminilo y asparaginilo se desamidán con frecuencia a los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente. Alternativamente, estos residuos se desamidán en condiciones ligeramente ácidas. Cualquier forma de estos residuos cae dentro del alcance de esta invención.

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

Otro tipo de modificación covalente de las construcciones de anticuerpos incluidas dentro del alcance de esta invención comprende alterar el patrón de glicosilación de la proteína. Como es conocido en la técnica, los patrones de glicosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (*p. ej.*, la presencia o ausencia de residuos de aminoácidos de glicosilación particulares, comentados más adelante) como de la célula huésped u organismo en el que se produce la proteína. Sistemas de expresión particulares se comentan más adelante.

La glicosilación de polipéptidos está típicamente enlazada a N o a O. Enlazada a N se refiere a la fijación del resto hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la fijación enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación enlazada a O se refiere a la fijación de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa, a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación a la construcción de anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos arriba descritas (para los sitios de glicosilación enlazados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia de partida (para los sitios de glicosilación enlazados a O). Para mayor facilidad, la secuencia de aminoácidos de una construcción de anticuerpo se altera preferiblemente mediante cambios al nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido en bases preseleccionadas de modo que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio de aumentar el número de restos de hidratos de carbono en la construcción del anticuerpo es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción de la proteína en una célula huésped que tiene capacidades de glicosilación para la glicosilación enlazada a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el o los azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 y en Aplin y Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306.

La eliminación de restos de hidratos de carbono presentes en la construcción del anticuerpo de partida se puede realizar de forma química o enzimática. La desglicosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la

mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja intacto el polipéptido. La desglicosilación química está descrita por Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de restos de hidratos de carbono en polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una diversidad de endo- y exo-glicosidasas tal como se describe por Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. La glicosilación en los sitios potenciales de glicosilación puede evitarse mediante el uso del compuesto tunicamicina como se describe por Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces proteína-N-glicósido.

También se contemplan en esta memoria otras modificaciones de la construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla. Por ejemplo, otro tipo de modificación covalente de la construcción de anticuerpo comprende enlazar la construcción de anticuerpo a diversos polímeros no proteicos, que incluyen, pero no se limitan a diversos polioles, tales como polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, de la manera recogida en las Patentes de EE.UU. N°s 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. Además, como se conoce en la técnica, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos en diversas posiciones dentro de la construcción del anticuerpo, p. ej., con el fin de facilitar la adición de polímeros tales como PEG.

En algunas realizaciones, la modificación covalente de las construcciones de anticuerpos de la invención comprende la adición de uno o más marcadores. El grupo de marcaje se puede acoplar a la construcción de anticuerpo *vía* brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. Se conocen en la técnica diversos métodos para marcar proteínas y se pueden utilizar para realizar la presente invención. El término "marcador" o "grupo de marcaje" se refiere a cualquier marcador detectable. En general, los marcadores se clasifican en una diversidad de clases, dependiendo del ensayo en el que se han de detectar - los siguientes ejemplos incluyen, pero no se limitan a:

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

b) marcadores magnéticos (*p. ej.*, partículas magnéticas)

c) restos activos redox

d) colorantes ópticos (incluyendo, pero no limitados a cromóforos, fósforos y fluoróforos), tales como grupos fluorescentes (*p. ej.*, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), grupos quimioluminiscentes y fluoróforos que pueden ser de "molécula pequeña" fluorescentes o proteicos fluorescentes

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

f) grupos biotinilados

g) epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (*p. ej.*, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos, etc.)

Por "marcador fluorescente" se entiende cualquier molécula que pueda detectarse *vía* sus propiedades fluorescentes inherentes. Marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde malacita, estilbeno, amarillo lucifer, azul cascada, rojo Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Rojo 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, verde Oregón, los colorantes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Azul Cascada, Amarillo Cascada y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rodamina y Rojo Texas (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Colorantes ópticos adecuados, incluyendo los fluoróforos, se describen en Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland.

Marcadores fluorescentes proteicos adecuados también incluyen, pero no se limitan a proteína fluorescente verde, que incluye una especie de GFP Renilla, Ptilosarcus o Aequorea (Chalfie et al., 1994, Science 263: 802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Número de Acceso de Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8ª planta, Montreal, Quebec, Canadá H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al. al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferasa (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β galactosidasa (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) y Renilla (documentos WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, Patentes de EE.UU. N°s 5.292.658; 5.418.155; 5.683.888; 5.741.668; 5.777.079; 5.804.387; 5.874.304; 5.876.995; 5.925.558).

Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que fomentan la oligomerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión al ADN (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759), y desde entonces se han encontrado en una diversidad de proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran péptidos que se producen de forma natural y derivados de los

5 mismos que dimerizan o trimerizan. En la solicitud PCT WO 94/10308 se describen ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles, y la cremallera de leucina derivada de la proteína tensioactiva pulmonar D (SPD) descrita en Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga condensada a la misma se describe en Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267- 78. En un enfoque, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden el fragmento o derivado del anticuerpo CDH3 condensado con un péptido de cremallera de leucina se expresan en células huésped adecuadas, y los fragmentos o derivados del anticuerpo CDH3 oligomérico soluble que se forman se recuperan del sobrenadante del cultivo.

10 La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención también puede comprender dominios adicionales, que son, *p. ej.*, útiles en el aislamiento de la molécula o se relacionan con un perfil farmacocinético adaptado de la molécula. Dominios de ayuda para el aislamiento de una construcción de anticuerpo pueden seleccionarse de motivos peptídicos o restos introducidos de forma secundaria, que pueden capturarse en un método de aislamiento, *p. ej.*, una columna de aislamiento. Realizaciones no limitantes de dominios adicionales de este tipo comprenden motivos peptídicos conocidos como etiqueta Myc, etiqueta HAT, etiqueta HA, etiqueta TAP, etiqueta GST, 15 dominio de unión a quitina (etiqueta CBD), proteína de unión a maltosa (etiqueta MBP), etiqueta Flag, etiqueta Strep y variantes de los mismos (*p. ej.*, etiqueta Strepll) y etiqueta His. Se prefiere que todas las construcciones de anticuerpos descritas en esta memoria caracterizadas por las CDRs identificadas comprendan un dominio de etiqueta His, que generalmente se conoce como una repetición de residuos His consecutivos en la secuencia de aminoácidos de una molécula, preferiblemente de cinco, y más preferiblemente de seis residuos His (hexa-histidina, véase la SEQ ID NO: 436). La etiqueta His puede estar situada, *p. ej.*, en el extremo N o C de la construcción de anticuerpo, preferiblemente está situada en el extremo C. Lo más preferiblemente, una etiqueta de hexa-histidina (HHHHHH) se enlaza mediante un enlace peptídico al extremo C de la construcción de anticuerpo de acuerdo con la invención.

25 El primer dominio de unión humano de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la presente invención se une a CDH3 humana y de macaco en la superficie de una célula diana. La secuencia de aminoácidos de la CDH3 humana está representada por SEQ ID NO: 1. Se entiende que la expresión "en la superficie", en el contexto de la presente invención, significa que el dominio de unión se une específicamente a un epítipo o agrupación de epítipos comprendida dentro del dominio extracelular de CDH3 (CDH3 ECD, por sus siglas en inglés), en donde los dominios de unión tienen el siguiente formato: pares de regiones VH y regiones VL en el formato de un scFv. Por lo tanto, el primer dominio de unión de acuerdo con la invención se une a CDH3 cuando se expresa en células o líneas celulares que se expresan de forma natural y/o en células o líneas celulares transformadas o transfectadas (de forma estable/transitoria) con CDH3. En una realización preferida, el primer dominio de unión también se une a CDH3 cuando CDH3 se utiliza como una molécula "diana" o "ligando" en un ensayo de unión *in vitro* tal como BIAcore o Scatchard. 30 La "célula diana" puede ser cualquier célula procariota o eucariota que exprese CDH3 en su superficie; preferiblemente, la célula diana es una célula que forma parte del cuerpo humano o animal, tal como una célula tumoral o cancerosa.

La expresión "ECD CDH3" se refiere a una forma de CDH3 que está esencialmente libre de dominios transmembrana y citoplasmático de CDH3. El experto en la materia entenderá que el dominio transmembrana identificado para el polipéptido CDH3 de la presente invención se identifica de acuerdo con los criterios empleados rutinariamente en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero lo más probable es no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio específicamente mencionado en esta memoria. Un CDH3 ECD humano preferido se muestra en SEQ ID NO: 3. 40

45 La afinidad del primer dominio de unión por CDH3 humana es preferiblemente ≤ 15 nM, más preferiblemente ≤ 10 nM, incluso más preferiblemente ≤ 5 nM, incluso más preferiblemente ≤ 1 nM, incluso más preferiblemente $\leq 0,5$ nM, incluso más preferiblemente $\leq 0,1$ nM, y lo más preferiblemente $\leq 0,05$ nM. La afinidad se puede medir, por ejemplo, en un ensayo BIAcore o en un ensayo Scatchard, *p. ej.*, como se describe en los Ejemplos. Otros métodos para determinar la afinidad son bien conocidos por la persona experta.

50 Las células T o linfocitos T son un tipo de linfocito (en sí mismo un tipo de glóbulo blanco) que juegan un papel central en la inmunidad mediada por células. Existen subconjuntos de células T, cada uno con una función distinta. Las células T se pueden distinguir de otros linfocitos, tales como células B y células NK, por la presencia de un receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) en la superficie celular. El TCR es el responsable de reconocer antígenos unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y está compuesto por dos cadenas de proteínas diferentes. En el 95 % de las células T, el TCR consiste en una cadena alfa (α) y una cadena beta (β). Cuando el TCR interactúa con el péptido antigénico y el MHC (complejo péptido/MHC), el linfocito T se activa a través de una serie de eventos bioquímicos mediados por enzimas asociadas, co-receptores, moléculas adaptadoras especializadas y factores de transcripción activados o liberados. 55

60 El complejo del receptor CD3 es un complejo proteico y está compuesto por cuatro cadenas. En los mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 γ (gamma), una cadena CD3 δ (delta) y dos cadenas CD3 ϵ (épsilon). Estas cadenas se asocian con el receptor de linfocitos T (TCR) y la denominada cadena ζ (zeta) para formar el complejo receptor de linfocitos T CD3 y generar una señal de activación en los linfocitos T. Las cadenas CD3 γ (gamma), CD3 δ (delta) y CD3 ϵ (épsilon) son proteínas de la superficie celular muy relacionadas de la superfamilia de inmunoglobulinas que contienen un único dominio de inmunoglobulina extracelular. Las colas intracelulares de las moléculas de CD3 65

contienen un único motivo conservado, conocido como un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina o ITAM para abreviar, que es esencial para la capacidad de señalización del TCR. La molécula de CD3 épsilon es un polipéptido que en seres humanos está codificada por el gen *CD3E* que reside en el cromosoma 11. El epítipo de unión a CD3 más preferido corresponde a los residuos de aminoácidos 1-27 del dominio extracelular de CD3 épsilon humana.

La lisis redirigida de las células diana a través del reclutamiento de células T por la construcción de anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla implica la formación de sinapsis citolíticas y el suministro de perforina y granzimas. Las células T comprometidas son capaces de lisis de células diana en serie y no se ven afectadas por mecanismos de escape inmunes que interfieran con el procesamiento y presentación del antígeno peptídico o la diferenciación de células T clonales; véase, por ejemplo, el documento WO 2007/042261.

La citotoxicidad mediada por construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3/CD3 se puede medir de diversas maneras. Las células efectoras pueden ser, p. ej., células T CD8 positivas (humanas) enriquecidas estimuladas o células mononucleares de la sangre periférica (humanas) no estimuladas (PBMC). Si las células diana son de origen macaco o expresan o son transfectadas con CDH3 de macaco, las células efectoras también deberían ser de origen macaco, tal como una línea de células T de macaco, p. ej., 4119LnPx. Las células diana deberían expresar (al menos el dominio extracelular de) CDH3, p. ej., CDH3 humana o de macaco. Las células diana pueden ser una línea celular (tal como CHO) que se transfecta de forma estable o transitoria con CDH3, p. ej., CDH3 humana o de macaco. Alternativamente, las células diana pueden ser una línea celular de expresión natural positiva para CDH3. Habitualmente, se espera que los valores de CE₅₀ sean más bajos con las líneas celulares diana que expresan niveles más altos de CDH3 en la superficie celular. La relación entre la célula efectora a diana (E:T) es habitualmente de aproximadamente 10:1, pero también puede variar. La actividad citotóxica de construcciones de anticuerpos biespecíficos CDH3/CD3 se puede medir en un ensayo de liberación de cromo 51 (tiempo de incubación de aproximadamente 18 horas) o en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS (tiempo de incubación de aproximadamente 48 horas). También son posibles modificaciones del tiempo de incubación del ensayo (reacción citotóxica). Otros métodos para medir la citotoxicidad son bien conocidos por la persona experta y comprenden ensayos MTT o MTS, ensayos basados en ATP, incluyendo ensayos bioluminiscentes, el ensayo de sulforrodamina B (SRB), el ensayo WST, ensayo clonogénico y la tecnología ECIS.

La actividad citotóxica mediada por construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3/CD3 de la presente invención se mide preferiblemente en un ensayo de citotoxicidad basado en células. También se puede medir en un ensayo de liberación de cromo 51. Se representa por el valor de CE₅₀, que corresponde a la concentración efectiva media máxima (concentración de la construcción de anticuerpo que induce una respuesta citotóxica a medio camino entre el valor de referencia y el máximo). Preferiblemente, el valor CE₅₀ de las construcciones de anticuerpos biespecíficos CDH3xCD3 es ≤ 5000 pg/ml o ≤ 4000 pg/ml, más preferiblemente ≤ 3000 pg/ml o ≤ 2000 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 1000 pg/ml o ≤ 500 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 400 pg/ml o ≤ 300 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 200 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 100 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 50 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 20 pg/ml o ≤ 10 pg/ml, y lo más preferiblemente ≤ 5 pg/ml.

Los valores de CE₅₀ arriba dados se pueden medir en diferentes ensayos. La persona experta en la materia es consciente de que se puede esperar que un valor de CE₅₀ sea menor cuando se utilizan células T CD8+ estimuladas / enriquecidas como células efectoras, en comparación con PBMC no estimuladas. Además, se puede esperar que los valores de CE₅₀ sean más bajos cuando las células diana expresan un número elevado del antígeno diana en comparación con una rata de baja expresión diana. Por ejemplo, cuando se utilizan células T CD8+ humanas estimuladas/enriquecidas como células efectoras (y se utilizan como células transfectadas con CDH3 tales como células CHO, o una línea celular de expresión natural positiva para CDH3 tal como A431), el valor CE₅₀ de la construcción de anticuerpo biespecífico CDH3xCD3 es preferiblemente ≤ 1000 pg/ml, más preferiblemente ≤ 500 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 250 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 100 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 50 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 10 pg/ml, y lo más preferiblemente ≤ 5 pg/ml. Cuando se utilizan PBMCs humanas como células efectoras, el valor CE₅₀ de la construcción de anticuerpo biespecífico CDH3xCD3 es preferiblemente ≤ 5000 pg/ml o ≤ 4000 pg/ml (en particular, cuando las células diana son una línea celular de expresión natural positiva para CDH3 tal como A431), más preferiblemente ≤ 2000 pg/ml (en particular cuando las células diana son células transfectadas con CDH3 tales como las células CHO), más preferiblemente ≤ 1000 pg/ml o ≤ 500 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 200 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 150 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 100 pg/ml y lo más preferiblemente ≤ 50 pg/ml, o menos. Cuando se utiliza una línea de células T de macaco, tal como LnPx4119, como células efectoras, y una línea de células transfectadas con CDH3 de macaco, tal como células CHO, se utiliza como línea de células diana, el valor CE₅₀ de la construcción de anticuerpo biespecífico CDH3xCD3 es preferiblemente ≤ 2000 pg/ml o ≤ 1500 pg/ml, más preferiblemente ≤ 1000 pg/ml o ≤ 500 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 300 pg/ml o ≤ 250 pg/ml, incluso más preferiblemente ≤ 100 pg/ml, y lo más preferiblemente ≤ 50 pg/ml.

Preferiblemente, las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3/CD3 de la presente invención no inducen/median en la lisis o esencialmente no inducen/median en la lisis de células CDH3 negativas tales como células CHO. La expresión "no inducen la lisis", "no inducen esencialmente la lisis", "no median en la lisis" o "no median esencialmente en la lisis" significa que una construcción de anticuerpo de la presente invención no induce ni media en la lisis de más de 30 %, preferiblemente no más del 20 %, más preferiblemente no más del 10 %, de manera

particularmente preferida no más de 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % de células CDH3 negativas, por lo que la lisis de una línea celular CDH3 positiva tal como A431 se establece en 100 %. Esto se aplica habitualmente a concentraciones de la construcción de anticuerpo de hasta 500 nM. La persona experta sabe cómo medir la lisis celular sin más preámbulos. Además, la presente memoria descriptiva enseña instrucciones específicas sobre cómo medir la lisis celular.

A la diferencia en la actividad citotóxica entre la isoforma monomérica y dimérica de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3/CD3 individuales se la alude como "brecha de potencia". Esta brecha de potencia se puede calcular, p. ej., como la relación entre los valores de CE_{50} de la forma monomérica y dimérica de la molécula. Las brechas de potencia de las construcciones de anticuerpos biespecíficos CDH3/CD3 de la presente invención son preferiblemente ≤ 5 , más preferiblemente ≤ 4 , incluso más preferiblemente ≤ 3 , incluso más preferiblemente ≤ 2 y lo más preferiblemente ≤ 1 . Como ejemplo, se determinó que la brecha de potencia para CDH3-13 era 0,5, se determinó que la brecha de potencia para CDH3-13xCD3-HLE (Fc) era 0,9, se determinó que la brecha de potencia para CDH3-25 era 0,7 y también se determinó que la brecha de potencia para CDH3-25xCD3-HALB era 0,7.

El primero y/o el segundo (o cualquier otro) dominio(s) de unión de la construcción de anticuerpo de la invención es/son preferiblemente específico de especies cruzadas para miembros del orden de primates de mamíferos. Dominios de unión a CD3 específicos para especies cruzadas se describen, por ejemplo, en el documento WO 2008/119567. De acuerdo con una realización, el primer y/o segundo dominio de unión, además de unirse a CDH3 humana y CD3 humana, respectivamente, también se unirán a CDH3/CD3 de primates que incluyen (pero no se limitan a) primates del nuevo mundo (tales como *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* o *Saimiri sciureus*), primates del viejo mundo (tales como babuinos y macacos), gibones y *homininae* no humanos.

En un aspecto de la invención, el primer dominio de unión humano se une a CDH3 humana y se une, además, a CDH3 de macaco, tal como CDH3 de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 5), y más preferiblemente, a CDH3 ECD de macaco. La afinidad del primer dominio de unión por CDH3 de macaco es preferiblemente ≤ 15 nM, más preferiblemente ≤ 10 nM, incluso más preferiblemente ≤ 5 nM, incluso más preferiblemente ≤ 1 nM, incluso más preferiblemente $\leq 0,5$ nM, incluso más preferiblemente $\leq 0,1$ nM, y lo más preferiblemente $\leq 0,05$ nM o incluso $\leq 0,01$ nM.

Preferiblemente, la brecha de afinidad de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de acuerdo con la invención para unir CDH3 de macaco frente a CDH3 humana [ma CDH3:hu CDH3] (según se determina, p. ej., mediante análisis BiaCore o Scatchard, véanse los Ejemplos) está entre 0,1 y 10, más preferiblemente entre 0,2 y 5, incluso más preferiblemente entre 0,3 y 2,5, incluso más preferiblemente entre 0,4 y 2, y lo más preferiblemente entre 0,5 y 1.

En una realización de la construcción de anticuerpos de la invención, el segundo dominio de unión se une a CD3 épsilon de seres humanos y de *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* o *Saimiri sciureus*. Preferiblemente, el segundo dominio de unión se une a un epítipo extracelular de estas cadenas de CD3 épsilon. También se prevé que el segundo dominio de unión se una a un epítipo extracelular de la cadena de CD3 épsilon humana y de *Macaca*. El epítipo más preferido de CD3 épsilon está comprendido dentro de los residuos de aminoácidos 1-27 del dominio extracelular de CD3 épsilon humana. Incluso más específicamente, el epítipo comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu. *Callithrix jacchus* y *Saguinus oedipus* son ambos primates del nuevo mundo pertenecientes a la familia *Callitrichidae*, mientras que *Saimiri sciureus* es un primate del nuevo mundo perteneciente a la familia *Cebidae*.

Se prefiere particularmente para la construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla de la presente invención que el segundo dominio de unión que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T comprenda una región VL que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 seleccionada de:

- (a) CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 27 del documento WO 2008/119567, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 28 del documento WO 2008/119567 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 29 del documento WO 2008/119567;
- (b) CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 117 del documento WO 2008/119567, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 118 del documento WO 2008/119567 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 119 del documento WO 2008/119567; y
- (c) CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 153 del documento WO 2008/119567, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 154 del documento WO 2008/119567 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 155 del documento WO 2008/119567.

En una realización alternativamente preferida de la construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla de la presente invención el segundo dominio de unión que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T comprende una región VH que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 seleccionada de:

- (a) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 12 del documento WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 13 del documento WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 14 del documento WO 2008/119567;
- (b) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 30 del documento WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 31 del documento WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 32 del documento WO 2008/119567;
- (c) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 48 del documento WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 49 del documento WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 50 del documento WO 2008/119567;
- (d) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 66 del documento WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 67 del documento WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 68 del documento WO 2008/119567;
- (e) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 84 del documento WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 85 del documento WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 86 del documento WO 2008/119567;
- (f) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 102 del documento WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 103 del documento WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 104 del documento WO 2008/119567;
- (g) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 120 del documento WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 121 del documento WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 122 del documento WO 2008/119567;
- (h) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 138 del documento WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 139 del documento WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 140 del documento WO 2008/119567;
- (i) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 156 del documento WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 157 del documento WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 158 del documento WO 2008/119567; y
- (j) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 174 del documento WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 175 del documento WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 176 del documento WO 2008/119567.

Se prefiere, además, para la construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla de la presente invención que el segundo dominio de unión que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T comprenda una región VL seleccionada del grupo que consiste en una región VL como se representa en SEQ ID NO: 35, 39, 125, 129, 161 o 165 del documento WO 2008/119567.

Alternativamente, se prefiere que el segundo dominio de unión que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T comprenda una región VH seleccionada del grupo que consiste en una región VH como se representa en SEQ ID NO: 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 o 181 del documento WO 2008/119567.

Más preferiblemente, la construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla de la presente invención se caracteriza por el segundo dominio de unión que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T que comprende una región VL y una región VH seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 17 o 21 del documento WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 15 o 19 del documento WO 2008/119567;
- (b) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 35 o 39 del documento WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 33 o 37 del documento WO 2008/119567;
- (c) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 53 o 57 del documento WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 51 o 55 del documento WO 2008/119567;
- (d) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 71 o 75 del documento WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 69 o 73 del documento WO 2008/119567;

(e) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 89 o 93 del documento WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 87 o 91 del documento WO 2008/119567;

(f) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 107 o 111 del documento WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 105 o 109 del documento WO 2008/119567;

(g) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 125 o 129 del documento WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 123 o 127 del documento WO 2008/119567;

(h) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 143 o 147 del documento WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 141 o 145 del documento WO 2008/119567;

(i) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 161 o 165 del documento WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 159 o 163 del documento WO 2008/119567; y

(j) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 179 o 183 del documento WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 177 o 181 del documento WO 2008/119567.

Los dominios de unión anteriores que se unen a CD3 humana y que se describen en el documento WO 2008/119567 también se representan en las presentes SEQ ID NOs: 445-537.

De acuerdo con una realización preferida de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la presente invención, los dominios de unión y, en particular, el segundo dominio de unión (que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T) tienen el siguiente formato: Los pares de regiones VH y VL están en el formato de un anticuerpo de cadena sencilla (scFv). Las regiones VH y VL están dispuestas en el orden VH-VL o VL-VH. Se prefiere que la región VH esté situada en el extremo N de una secuencia de enlazador y que la región VL esté situada en el extremo C de la secuencia de enlazador.

Una realización preferida de la construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla arriba descrita se caracteriza porque el segundo dominio de unión que se une CD3 humana en la superficie de una célula T comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 o 187 del documento WO 2008/119567.

En una realización de la presente invención, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias como se representan en SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 238, y SEQ ID NO: 248.

En otra realización de la presente invención, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias como se representan en SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 380, SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 382, SEQ ID NO: 383, SEQ ID NO: 384, SEQ ID NO: 385, SEQ ID NO: 386, SEQ ID NO: 387, SEQ ID NO: 388 y SEQ ID NO: 389.

En otra realización de la presente invención, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias como se representan en SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 318, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 338, SEQ ID NO: 348, y SEQ ID NO: 358.

También se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos descritas en esta memoria. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de la construcción de anticuerpo. Variantes de la secuencia de aminoácidos de las construcciones de anticuerpos se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico de las construcciones de anticuerpos o mediante síntesis de péptidos. Todas las modificaciones de la secuencia de aminoácidos descritas más adelante deberían dar como resultado una construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla que todavía conserve la actividad biológica deseada (unión a CDH3 y a CD3) de la molécula parental no modificada.

El término "aminoácido" o la expresión "residuo de aminoácido" se refiere típicamente a un aminoácido que tiene su definición reconocida en la técnica, tal como un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: alanina (Ala o A); arginina (Arg o R); asparagina (Asn o N); ácido aspártico (Asp o D); cisteína (Cys o C); glutamina (Gln o Q); ácido glutámico (Glu o E); glicina (Gly o G); histidina (His o H); isoleucina (Ile o I); leucina (Leu o L); lisina (Lys o K); metionina (Met o M); fenilalanina (Phe o F); prolina (Pro o P); serina (Ser o S); treonina (Thr o T); triptófano (Trp o W); tirosina (Tyr o Y); y valina (Val o V), aunque se pueden utilizar aminoácidos modificados, sintéticos o raros según se desee. Generalmente, los aminoácidos se pueden agrupar por tener una cadena lateral apolar (p. ej., Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); una cadena lateral cargada negativamente (p. ej., Asp, Glu); una cadena lateral cargada positivamente

(p. ej., Arg, His, Lys); o una cadena lateral polar no cargada (p. ej., Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp y Tyr).

Modificaciones de aminoácidos incluyen, por ejemplo, delecciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de las construcciones de anticuerpos. Se realiza cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos postraduccionales de las construcciones de anticuerpos, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Por ejemplo, se pueden insertar o eliminar 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos en cada una de las CDRs (por supuesto, dependiendo de su longitud), mientras que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 25 aminoácidos se pueden insertar o eliminar en cada una de las FRs. Preferiblemente, las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intra-secuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Una variante de inserción de la construcción de anticuerpo de la invención incluye la fusión al extremo N o al extremo C de la construcción de anticuerpo de una enzima o la fusión a un polipéptido que aumenta la semivida en suero de la construcción de anticuerpo.

Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las CDRs de la cadena pesada y/o ligera, en particular las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de la FR en la cadena pesada y/o ligera. Las sustituciones son preferiblemente sustituciones conservativas tal como se describe en esta memoria. Preferiblemente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos pueden estar sustituidos en una CDR, mientras que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 25 aminoácidos pueden estar sustituidos en las regiones marco (FRs), dependiendo de la longitud de la CDR o FR. Por ejemplo, si una secuencia de CDR comprende 6 aminoácidos, se prevé que uno, dos o tres de estos aminoácidos estén sustituidos. De manera similar, si una secuencia de CDR comprende 15 aminoácidos, se prevé que uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de estos aminoácidos estén sustituidos.

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

Aquellas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan luego introduciendo variantes adicionales o de otro tipo en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio o la región para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminada, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar u optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se puede realizar un barrido de alanina o una mutagénesis aleatoria en un codón o región diana, y las variantes de construcción de anticuerpos expresadas se rastrean en cuanto a la combinación óptima de actividad deseada. Técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados del ADN que tienen una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, mutagénesis del cebador M13 y mutagénesis por PCR. El rastreo de los mutantes se realiza utilizando ensayos de actividades de unión a antígenos, tales como la unión de CDH3 o CD3.

Generalmente, si los aminoácidos están sustituidos en una o más o todas las CDRs de la cadena pesada y/o ligera, se prefiere que la secuencia "sustituida" obtenida entonces sea al menos 60 %, más preferiblemente 65 %, incluso más preferiblemente 70 %, de manera particularmente preferida 75 %, de manera más particularmente preferida 80 % idéntica a la secuencia CDR "original". Esto significa que depende de la longitud de la CDR hasta qué punto es idéntica a la secuencia "sustituida". Por ejemplo, una CDR que tiene 5 aminoácidos es preferiblemente un 80 % idéntica a su secuencia sustituida con el fin de tener al menos un aminoácido sustituido. Por consiguiente, las CDRs de la construcción de anticuerpo pueden tener diferentes grados de identidad con sus secuencias sustituidas, p. ej., CDRL1 puede tener un 80 %, mientras que CDRL3 puede tener un 90 %.

Sustituciones (o reemplazos) preferidas son sustituciones conservadoras. Sin embargo, cualquier sustitución (incluyendo la sustitución no conservativa o una o más de las "sustituciones ejemplares" enumeradas en la Tabla 1, que figura más adelante) está prevista siempre que la construcción de anticuerpo conserve su capacidad para unirse a través del primer dominio de unión y a CD3 o CD3 épsilon a través del segundo dominio de unión y/o sus CDRs tengan una identidad con la secuencia entonces sustituida (al menos 60 %, más preferiblemente 65 %, incluso más preferiblemente 70 %, de manera particularmente preferida 75 %, de manera más particularmente preferida 80 % idéntica a la secuencia CDR "original").

Sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si sustituciones de este tipo dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse

cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y los productos pueden seleccionarse para una característica deseada.

Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos

Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gln, asn	lys
Asn (N)	gln, his, asp, lys, arg	gln
Asp (D)	glu, asn	glu
Cys (C)	ser, ala	ser
Gln (Q)	asn, glu	asn
Glu (E)	asp, gln	asp
Gly (G)	Ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe	leu
Leu (L)	norleucina, ile, val, met, ala	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala	leu

5

Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de la construcción de anticuerpos de la presente invención se logran seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los residuos que se producen de forma natural se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral: (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile; (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr; (3) de carácter ácido: asp, glu; (4) de carácter básico: asn, gln, his, lys, arg; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

15

Sustituciones no conservadoras supondrán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación adecuada de la construcción de anticuerpo puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación aberrante. A la inversa, se pueden añadir enlace(s) de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente en los casos en los que el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

20

Para las secuencias de aminoácidos, la identidad y/o similitud de secuencia se determina utilizando técnicas estándares conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, el algoritmo de alineamiento de identidad de secuencia de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444, implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), el programa de secuencia Best Fit descrito por Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, preferiblemente utilizando la configuración predeterminada, o mediante inspección. Preferiblemente, FastDB calcula el porcentaje de identidad en base a los siguientes parámetros: penalización por desajuste de 1; penalización por hueco de 1; penalización por tamaño de hueco de 0,33; y penalización de unión de 30, "Current Methods in Sequence

25

30

Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Un ejemplo de algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento de secuencia múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineamientos progresivos por pares. También puede trazar un árbol que muestre las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear el alineamiento. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360; el método es similar al descrito por Higgins y Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153. Parámetros útiles de PILEUP que incluyen un peso de hueco predeterminado de 3,00, un peso de longitud de hueco predeterminado de 0,10 y huecos finales ponderados.

Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en: Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; y Karin et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787. Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 que se obtuvo de Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480. WU-BLAST-2 utiliza varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establecen en los valores predeterminados. Los parámetros ajustables se configuran con los siguientes valores: intervalo de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125, umbral de palabra (T) = 11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y los establece el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular y la composición de la base de datos particular contra la cual se busca la secuencia de interés; sin embargo, los valores se pueden ajustar para aumentar la sensibilidad.

Un algoritmo útil adicional es BLAST con huecos de acuerdo con lo informado por Altschul et al., 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389- 3402. BLAST con huecos utiliza puntuaciones de sustitución BLOSUM-62; parámetro de umbral T establecido en 9; el método de dos aciertos para activar extensiones sin huecos, cobra longitudes de hueco de k a un coste de 10+k; Xu se establece en 16 y Xg se establece en 40 para la fase de búsqueda de la base de datos y en 67 para la fase de salida de los algoritmos. Los alineamientos con huecos se activan mediante una puntuación correspondiente a aproximadamente 22 bits.

Generalmente, la homología, similitud o identidad de aminoácidos entre las CDRs variantes individuales son al menos el 60% de las secuencias representadas en esta memoria, y más típicamente con homologías o identidades preferiblemente crecientes de al menos 65% o 70%, más preferiblemente al menos 75% u 80%, incluso más preferiblemente al menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y casi 100%. De manera similar, el "porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a la secuencia de ácido nucleico de las proteínas de unión identificadas en esta memoria se define como el porcentaje de residuos de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de nucleótidos en la secuencia codificante de la construcción del anticuerpo. Un método específico utiliza el módulo BLASTN de WU-BLAST-2 configurado con los parámetros predeterminados, con el intervalo de solapamiento y la fracción de solapamiento configurados en 1 y 0,125, respectivamente.

En general, la homología, similitud o identidad de aminoácidos entre las CDRs variantes individuales que codifican las secuencias de nucleótidos y las secuencias de nucleótidos representadas en esta memoria es de al menos un 60 %, y más típicamente con homologías o identidades preferiblemente crecientes de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y casi 100 %. Por lo tanto, una "variante de CDR" es aquella con la homología, similitud o identidad especificadas con la CDR parental de la invención y comparte la función biológica, que incluye, pero no se limita a al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la especificidad y/o actividad de la CDR parental.

En una realización, las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de la presente invención exhiben altos rendimientos de monómeros en condiciones estándares a escala de investigación, p. ej., en un procedimiento estándar de purificación en dos etapas. Preferiblemente, el rendimiento de monómero de las construcciones de anticuerpos de acuerdo con la invención es $\geq 0,25$ mg/L de sobrenadante, más preferiblemente $\geq 0,5$ mg/L, incluso más preferiblemente ≥ 1 mg/L y lo más preferiblemente ≥ 3 mg/L de sobrenadante.

Del mismo modo, se puede determinar el rendimiento de las isoformas de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico dimérico y, por lo tanto, el porcentaje de monómero (es decir, monómero: (monómero + dímero)) de las construcciones de anticuerpos. La productividad de las construcciones de anticuerpos monoméricos y diméricos y el porcentaje de monómero calculado pueden obtenerse, p. ej., en la etapa de purificación SEC del sobrenadante de cultivo a partir de la producción estandarizada a escala de investigación en botellas de cultivo rotatorias. En una realización, el porcentaje de monómero de las construcciones de anticuerpos es ≥ 80 %, más preferiblemente ≥ 85 %, incluso más preferiblemente ≥ 90 % y lo más preferiblemente ≥ 95 %.

En una realización adicional, el porcentaje de identidad con la línea germinal humana de las construcciones de anticuerpos de acuerdo con la invención es ≥ 70 % o ≥ 75 %, más preferiblemente ≥ 80 % o ≥ 85 %, incluso más preferiblemente ≥ 90 % y lo más preferiblemente ≥ 95 %. Véase el Ejemplo 7. Se cree que la identidad con los productos génicos de la línea germinal de anticuerpos humanos es una característica importante para reducir el riesgo de que las proteínas terapéuticas provoquen una respuesta inmunitaria contra el fármaco en el paciente durante el

tratamiento. Hwang y Foote ("Immunogenicity of engineered antibodies"; Methods 36 (2005) 3-10) demuestran que la reducción de porciones no humanas de construcciones de anticuerpos farmacológicos conduce a una disminución del riesgo de inducir anticuerpos anti-fármacos en los pacientes durante el tratamiento. Al comparar un número exhaustivo de fármacos de anticuerpos evaluados clínicamente y los datos de inmunogenicidad respectivos, se muestra la tendencia de que la humanización de las regiones V de los anticuerpos haga que la proteína sea menos inmunogénica (promedio del 5,1% de los pacientes) que los anticuerpos que llevan regiones V no humanas no alteradas. (promedio 23,59% de los pacientes). Por lo tanto, es deseable un mayor grado de identidad con las secuencias humanas para las terapias con proteínas basadas en la región V en forma de construcciones de anticuerpos. Para este propósito de determinar la identidad de la línea germinal, las regiones V de VL pueden alinearse con las secuencias de aminoácidos de los segmentos V y J de la línea germinal humana (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) utilizando el software Vector NTI y la secuencia de aminoácidos calculada dividiendo los residuos de aminoácidos idénticos por el número total de residuos de aminoácidos de la VL en porcentaje. Lo mismo puede ser para los segmentos VH (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) con la excepción de que la CDR3 de VH puede ser excluida debido a su alta diversidad y a la falta de participantes en el alineamiento de CDR3 de VH de la línea germinal humana existente. A continuación, pueden utilizarse técnicas recombinantes para aumentar la identidad de secuencia con genes de la línea germinal de anticuerpos humanos.

En una realización, las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos tienen una estabilidad plasmática preferida (relación de CE50 con plasma a CE50 sin plasma) de ≤ 5 , más preferiblemente ≤ 4 o $\leq 3,5$, incluso más preferiblemente ≤ 3 o $\leq 2,5$, y lo más preferiblemente ≤ 2 o $\leq 1,5$ o ≤ 1 . La estabilidad en plasma de una construcción de anticuerpo se puede testar mediante la incubación de la construcción en plasma humano a 37°C durante 24 horas, seguido de la determinación de CE50 en un ensayo de citotoxicidad de liberación de cromo 51. Las células efectoras en el ensayo de citotoxicidad se pueden estimular en células T CD8 positivas humanas enriquecidas. Las células diana pueden ser, por ejemplo, células CHO transfectadas con CDH3 humana. La relación entre la célula efectora a diana (E:T) se puede elegir como 10:1. El conjunto de plasma humano utilizado para este propósito se deriva de la sangre de donantes sanos recogida con jeringas recubiertas con EDTA. Los componentes celulares se eliminan por centrifugación y la fase plasmática superior se recoge y posteriormente se agrupa. Como control, las construcciones de anticuerpos se diluyen inmediatamente antes del ensayo de citotoxicidad en medio RPMI-1640. La estabilidad en plasma se calcula como la relación de CE50 (después de la incubación en plasma) a CE50 (control). Véase el Ejemplo 11.

Se prefiere que la conversión de monómero a dímero de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de la invención sea baja. La conversión se puede medir en diferentes condiciones y analizar mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento. Por ejemplo, la incubación de las isoformas monoméricas de las construcciones de anticuerpos puede llevarse a cabo durante 7 días a 37 °C y concentraciones de, por ejemplo, 100 µg/ml o 250 µg/ml en una incubadora. En estas condiciones, se prefiere que las construcciones de anticuerpos de la invención muestren un porcentaje de dímero que sea ≤ 5 %, más preferiblemente ≤ 4 %, incluso más preferiblemente ≤ 3 %, incluso más preferiblemente $\leq 2,5$ %, incluso más preferiblemente ≤ 2 %, incluso más preferiblemente $\leq 1,5$ %, y lo más preferiblemente ≤ 1 %. Véase el Ejemplo 9.

También se prefiere que las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de la presente invención presenten una conversión de dímero muy baja después de un cierto número de ciclos de congelación/descongelación. Por ejemplo, el monómero de construcción de anticuerpo se ajusta a una concentración de 250 µg/ml en tampón de formulación genérica y se somete a tres ciclos de congelación/descongelación (congelación a -80 °C durante 30 min, seguido de descongelación durante 30 min a temperatura ambiente), seguido de SEC de alto rendimiento para determinar el porcentaje de construcción de anticuerpo inicialmente monomérico, que se había convertido en construcción de anticuerpo dímérico. Preferiblemente, los porcentajes de dímeros de las construcciones de anticuerpos biespecíficos son ≤ 5 %, más preferiblemente ≤ 4 %, incluso más preferiblemente ≤ 3 %, incluso más preferiblemente $\leq 2,5$ %, incluso más preferiblemente ≤ 2 %, incluso más preferiblemente $\leq 1,5$ %, y lo más preferiblemente ≤ 1 %, por ejemplo después de tres ciclos de congelación/descongelación.

Las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de la presente invención muestran preferiblemente una termoestabilidad favorable con temperaturas de agregación superiores a 50 °C o superiores a 52 °C, más preferiblemente superiores a 54 °C o superiores a 55 °C, incluso más preferiblemente superiores a 56 °C o superiores a 57 °C, y lo más preferiblemente superiores a 58 °C o superiores a 59 °C. El parámetro de termoestabilidad se puede determinar en términos de temperatura de agregación de anticuerpos de la siguiente manera: la solución de anticuerpos a una concentración de 250 µg/ml se transfiere a una cubeta de un solo uso y se coloca en un dispositivo de dispersión de luz dinámica. La muestra se calienta de 40 °C a 70 °C a una tasa de calentamiento de 0,5 °C/min con adquisición constante del radio medido. El aumento del radio que indica la fusión de la proteína y la agregación se utiliza para calcular la temperatura de agregación del anticuerpo. Véase el Ejemplo 10.

Alternativamente, las curvas de temperatura de fusión se pueden determinar mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar las estabilidades biofísicas intrínsecas de las proteínas de las construcciones de anticuerpos. Estos experimentos se realizan utilizando un dispositivo VP-DSC de MicroCal LLC (Northampton, MA, EE.UU.). La absorción de energía de una muestra que contiene una construcción de anticuerpo se registra de 20°C a 90°C en comparación con una muestra que contiene solo el tampón de formulación. Las construcciones de anticuerpos

se ajustan a una concentración final de 250 µg/ml, p. ej., en tampón de desarrollo SEC. Para el registro de la curva de fusión respectiva, la temperatura total de la muestra se aumenta escalonadamente. A cada temperatura T se registra la absorción de energía de la muestra y la referencia del tampón de formulación. Se representa la diferencia en la absorción de energía C_p (kcal/mol/°C) de la muestra menos la referencia frente a la temperatura respectiva. La temperatura de fusión se define como la temperatura en el primer máximo de absorción de energía.

Además, se prevé que las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 de la invención no reaccionen de forma cruzada con (es decir, no se unan a) los parálogos de CDH3 humanos CDH1, CDH2, CDH4 y CDH5. Además, se prevé que los anticuerpos biespecíficos CDH3xCD3 de la invención no reaccionen de forma cruzada con (es decir, no se unan a) los parálogos de CDH3 de macaco / cyno CDH1, CDH2, CDH4 y CDH5. Véase el Ejemplo 6.

También se prevé que las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 de la invención tengan una turbidez (medida por OD340 después de la concentración del anticuerpo monomérico purificado a 2,5 mg/ml e incubación durante la noche) de $\leq 0,1$, lo más preferiblemente de $\leq 0,05$. Véase el Ejemplo 12.

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

Además, se prevé que las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de la presente invención exhiban eficacia terapéutica o actividad antitumoral. Esto puede evaluarse, p. ej., en un estudio como se describe en el Ejemplo 14.

La persona experta sabe cómo modificar o adaptar determinados parámetros de este estudio, tales como el número de células tumorales inyectadas, el sitio de inyección, el número de células T humanas trasplantadas, la cantidad de construcciones de anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla que se administrarán y los tiempos límites establecidos, sin dejar de llegar a un resultado significativo y reproducible. Preferiblemente, la inhibición del crecimiento del tumor T/C [%] es ≤ 70 o ≤ 60 , más preferiblemente ≤ 50 o ≤ 40 , incluso más preferiblemente ≤ 30 o ≤ 20 y lo más preferiblemente ≤ 10 o ≤ 5 o incluso $\leq 2,5$.

La invención proporciona, además, una molécula de polinucleótido / ácido nucleico que codifica la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención.

Un polinucleótido es un biopolímero compuesto por 13 o más monómeros de nucleótidos unidos covalentemente en una cadena. El ADN (tal como ADNc) y el ARN (tal como ARNm) son ejemplos de polinucleótidos con una función biológica distinta. Los nucleótidos son moléculas orgánicas que sirven como monómeros o subunidades de moléculas de ácido nucleico, tales como ADN o ARN. La molécula de ácido nucleico o polinucleótido puede ser de doble cadena y de cadena sencilla, lineal y circular. Preferiblemente está comprendida en un vector que preferiblemente está comprendido en una célula huésped. Dicha célula huésped es, p. ej., después de la transformación o transfección con el vector o el polinucleótido de la invención, capaz de expresar la construcción del anticuerpo. Para ese propósito, el polinucleótido o la molécula de ácido nucleico se enlaza operativamente con secuencias de control.

El código genético es el conjunto de reglas mediante las cuales la información codificada dentro del material genético (ácidos nucleicos) se traduce en proteínas. La descodificación biológica en las células vivas se logra mediante el ribosoma que enlaza los aminoácidos en un orden especificado por el ARNm, utilizando moléculas de ARNt para llevar aminoácidos y leer los tres nucleótidos del ARNm a la vez. El código define cómo las secuencias de estos tripletes de nucleótidos, denominados codones, especifican qué aminoácido se añadirán a continuación durante la síntesis de proteínas. Con algunas excepciones, un codón de tres nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico especifica un solo aminoácido. Debido a que la gran mayoría de genes son codificados con exactamente el mismo código, a este código particular se le alude a menudo como código genético canónico o estándar. Si bien el código genético determina la secuencia de proteínas para una región codificante dada, otras regiones genómicas pueden influir en cuándo y dónde se producen estas proteínas.

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

Un vector es una molécula de ácido nucleico que se utiliza como un vehículo para transferir material genético (extraño) a una célula. El término "vector" abarca, pero no se limita a - plásmidos, virus, cósmidos y cromosomas artificiales. En general, los vectores modificados comprenden un origen de replicación, un sitio de clonación múltiple y un marcador seleccionable. El vector en sí mismo es generalmente una secuencia de nucleótidos, habitualmente una secuencia de

ADN, que comprende una inserción (transgén) y una secuencia más grande que sirve como la "columna vertebral" del vector. Los vectores modernos pueden abarcar características adicionales además de la inserción del transgén y una columna vertebral: promotor, marcador genético, resistencia a antibióticos, gen informador, secuencia de fijación de objetivo, etiqueta de purificación de proteínas. Los vectores denominados vectores de expresión (construcciones de expresión) son específicamente para la expresión del transgén en la célula diana y generalmente tienen secuencias de control.

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

Un ácido nucleico está "operativamente enlazado" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o conductor secretor está operativamente enlazado al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente enlazado a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente enlazado a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, "operativamente enlazado" significa que las secuencias de ADN que se enlazan son contiguas y, en el caso de un conductor secretor, son contiguas y están en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La vinculación se logra mediante ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si no existe este tipo de sitios, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

La "transfección" es el proceso de introducir deliberadamente moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos (incluyendo los vectores) en células diana. El término se utiliza principalmente para métodos no virales en células eucariotas. La transducción se utiliza a menudo para describir la transferencia mediada por virus de moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos. La transfección de células animales implica típicamente la apertura de poros transitorios o "agujeros" en la membrana celular, para permitir la absorción de material. La transfección se puede llevar a cabo utilizando fosfato de calcio, por electroporación, por exprimido celular o mezclando un lípido catiónico con el material para producir liposomas, que se fusionan con la membrana celular y depositan su carga en el interior.

El término "transformación" se utiliza para describir la transferencia no viral de moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos (incluyendo vectores) a bacterias, y también a células eucariotas no animales, incluyendo células vegetales. La transformación es, por lo tanto, la alteración genética de una célula eucariota bacteriana o no animal resultante de la captación directa a través de la o las membranas celulares de su entorno y la incorporación posterior de material genético exógeno (moléculas de ácido nucleico). La transformación se puede efectuar por medios artificiales. Para que ocurra la transformación, las células o bacterias deben estar en un estado de competencia, lo que podría ocurrir como una respuesta limitada en el tiempo a condiciones del entorno tales como la inanición y la densidad celular.

Además, la invención proporciona una célula huésped transformada o transfectada con la molécula de polinucleótido/ácido nucleico o con el vector de la invención.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "célula huésped" o "célula receptora" pretende incluir cualquier célula individual o cultivo celular que pueda o puedan ser o haya o hayan sido receptoras de vectores, moléculas de ácido nucleico exógenas y polinucleótidos que codifican la construcción de anticuerpos de la presente invención; y/o receptores de la propia construcción de anticuerpo. La introducción del material respectivo en la célula se lleva a cabo mediante transformación, transfección y similares. La expresión "célula huésped" también pretende incluir la progenie o la progenie potencial de una sola célula. Debido a que determinadas modificaciones pueden producirse en las generaciones sucesivas debido a una mutación natural, accidental o deliberada o debido a influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico o total) a la célula parental, pero todavía está incluido dentro del alcance del término como se utiliza en esta memoria. Células huésped adecuadas incluyen células procariotas o eucariotas y también incluyen, pero no se limitan a bacterias, células de levaduras, células de hongos, células vegetales y células animales, tales como células de insectos y células de mamíferos, p. ej., ratones, ratas, macacos o seres humanos.

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

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o la levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el más comúnmente utilizado entre los

microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, un cierto número de otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en esta memoria, tales como *Schizosaccharomyces pombe*, huéspedes de *Kluyveromyces*, tales como *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402 226); *Pichia pastoris* (documento EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, tales como *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes de *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Células huésped adecuadas para la expresión de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico glicosilado de la invención se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirales y las correspondientes células huéspedes de insectos permisivas de huéspedes, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una diversidad de cepas virales para transfección están disponibles públicamente, p. ej., la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y virus de este tipo se pueden utilizar como el virus de esta memoria de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar como huéspedes cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, *Arabidopsis* y tabaco. Los expertos en la técnica conocen vectores de clonación y expresión útiles en la producción de proteínas en cultivos de células vegetales. Véase, p. ej., Hiatt et al., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko et al. (1995) *The Plant J* 8: 745-750, y Fecker et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un proceso de rutina. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36 : 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata de búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, 1413 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL5 1); células TRI (Mather et al., *Annals N. Y Acad. Sci.* (1982) 383: 44-68); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para la producción de una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención, comprendiendo dicho procedimiento cultivar una célula huésped de la invención en condiciones que permitan la expresión de la construcción de anticuerpo de la invención y recuperar del cultivo el anticuerpo producido.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "cultivo" se refiere al mantenimiento, diferenciación, crecimiento, proliferación y/o propagación *in vitro* de células bajo condiciones adecuadas en un medio. El término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción de una construcción de anticuerpo de la invención que incluye, pero no se limita a transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, la construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico o directamente se secreta en el medio. Si la construcción de anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, los desechos en partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) describen un proceso para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los desechos celulares se pueden eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de sistemas de expresión de este tipo se concentran generalmente primero utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención preparada a partir de las células huésped puede recuperarse o purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía-focalización, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están

disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar. En los casos en los que la construcción de anticuerpo de la invención comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación.

5 La cromatografía de afinidad es una técnica de purificación preferida. La matriz a la que está fijado el ligando de afinidad suele ser agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio de poros controlado o el poli (estirendivinil) benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa.

10 Además, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención o una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico producido de acuerdo con el procedimiento de la invención.

15 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición que es adecuada para la administración a un paciente, preferiblemente un paciente humano. La composición farmacéutica particularmente preferida de esta invención comprende una o una pluralidad de la o las construcciones de anticuerpos de la invención, preferiblemente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende, además, formulaciones adecuadas de uno o más soportes, estabilizadores, excipientes, diluyentes, solubilizantes, tensioactivos, emulsionantes, conservantes y/o adyuvantes (farmacéuticamente eficaces).
20 Constituyentes aceptables de la composición son preferiblemente no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a composiciones líquidas, congeladas y liofilizadas.

25 Las composiciones de la invención pueden comprender un soporte farmacéuticamente aceptable. En general, tal como se utiliza en esta memoria, "soporte farmacéuticamente aceptable" significa todas y cada una de las soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles, disolventes, tampones, p. ej., solución salina tamponada con fosfato (PBS), agua, suspensiones, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, liposomas, medios de dispersión y recubrimientos, que son compatibles con la administración farmacéutica, en particular con la administración parenteral. El uso de medios y agentes de este tipo en composiciones farmacéuticas es bien conocido en la técnica, y las composiciones que comprenden soportes de este tipo se pueden formular mediante métodos convencionales bien conocidos.

35 Determinadas realizaciones proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden la construcción de anticuerpo de la invención y, además, uno o más excipientes, tales como los descritos ilustrativamente en esta sección y en otras partes de esta memoria. Los excipientes se pueden utilizar en la invención a este respecto para una amplia diversidad de propósitos, tales como ajustar las propiedades físicas, químicas o biológicas de las formulaciones, tales como el ajuste de la viscosidad, y/o los procedimientos de la invención para mejorar la efectividad y/o estabilizar formulaciones de este tipo y procedimientos contra la degradación y el deterioro debido, por ejemplo, a las tensiones que se producen durante la fabricación, el transporte, el almacenamiento, la preparación previa al uso, la administración y posteriormente.

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

- aminoácidos tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, treonina, prolina, 2-fenilalanina, incluyendo aminoácidos cargados, preferiblemente lisina, acetato de lisina, arginina, glutamato y/o histidina;
- agentes antimicrobianos, tales como agentes antibacterianos y antifúngicos;
- antioxidantes tales como ácido ascórbico, metionina, sulfito de sodio o hidrógeno-sulfito de sodio;
- tampones, sistemas tampón y agentes tampón que se utilizan para mantener la composición a un pH fisiológico o a un pH ligeramente más bajo, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 o 9; ejemplos de tampones son borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos, succinato, fosfato, histidina y acetato; por ejemplo, tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5;
- disolventes no acuosos, tales como propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo;
- soportes acuosos que incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo medios salinos y tamponados;

- polímeros biodegradables tales como poliésteres;
- 5 • agentes espesantes, tales como manitol o glicina;
- agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA);
- agentes isotónicos y retardadores de la absorción;
- 10 • agentes complejantes, tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina)
- cargas;
- 15 • monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); los hidratos de carbono pueden ser azúcares no reductores, preferiblemente trehalosa, sacarosa, octasulfato, sorbitol o xilitol;
- 20 • proteínas (de bajo peso molecular), polipéptidos o soportes proteicos, tales como seroalbúmina humana o bovina, gelatina o inmunoglobulinas, preferiblemente de origen humano;
- agentes colorantes y aromatizantes;
- 25 • agentes reductores que contienen azufre, tales como glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio;
- agentes diluyentes;
- agentes emulsionantes;
- 30 • polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona);
- contraiones formadores de sales tales como sodio;
- 35 • conservantes, tales como agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares; ejemplos son: cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno);
- complejos metálicos tales como complejos de Zn-proteína;
- 40 • disolventes y co-disolventes (tales como glicerol, propilenglicol o polietilenglicol);
- azúcares y alcoholes de azúcar, tales como trehalosa, sacarosa, octasulfato, manitol, sorbitol o xilitol estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, mioininitosa, galactosa, lactitol, ribitol, mioininitol, galactitol, glicerol, ciclitales (p. ej., inositol), polietilenglicol; y alcoholes de azúcar polihídricos;
- 45 • agentes de suspensión;
- tensioactivos o agentes humectantes, tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos tal como polisorbato 20, polisorbato, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal; los tensioactivos pueden ser detergentes, preferiblemente con un peso molecular > 1,2 KD y/o un poliéter, preferiblemente con un peso molecular > 3 KD; ejemplos no limitantes de detergentes preferidos son Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 y Tween 85; ejemplos no limitantes de poliéteres preferidos son PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 y PEG 5000;
- 50 • agentes potenciadores de la estabilidad tales como sacarosa o sorbitol;
- agentes potenciadores de la tonicidad tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol;
- 55 • vehículos de administración parenteral, incluyendo solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijos;
- 60 • vehículos de administración parenteral, incluyendo solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijos;

- vehículos de administración intravenosa que incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los que se basan en la dextrosa de Ringer).

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

Se prevé que la composición de la invención podría comprender, además del polipéptido de la invención definido en esta memoria, agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uso pretendido de la composición. Agentes de este tipo pueden ser fármacos que actúan sobre el sistema gastrointestinal, fármacos que actúan como citostáticos, fármacos que previenen la hiperuricemia, fármacos que inhiben las inmunorreacciones (p. ej., corticosteroides), fármacos que modulan la respuesta inflamatoria, fármacos que actúan sobre el sistema circulatorio y/o agentes tales como las citoquinas conocidas en la técnica. También se prevé que la construcción de anticuerpos de la presente invención se aplique en una co-terapia, es decir, en combinación con otro medicamento contra el cáncer.

En determinadas realizaciones, un experto en la técnica determinará la composición farmacéutica óptima dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración pretendida, el formato de suministro y la dosis deseada. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *supra*. En determinadas realizaciones, composiciones de este tipo pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de eliminación *in vivo* de la construcción de anticuerpo de la invención. En determinadas realizaciones, el vehículo o soporte principal en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o soporte adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido ceforraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en las composiciones para administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos ejemplares adicionales. En determinadas realizaciones, la construcción de anticuerpos de las composiciones de la invención se puede preparar para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *supra*) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, en determinadas realizaciones, la construcción de anticuerpo de la invención se puede formular como un liofilizado utilizando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para uso en esta invención pueden proporcionarse en forma de una solución acuosa apirógena, parenteralmente aceptable, que comprende la construcción de anticuerpo deseada de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que la construcción de anticuerpo de la invención se formula como una solución isotónica estéril, debidamente conservada. En determinadas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bio-erosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar liberación controlada o sostenida del producto que puede suministrarse mediante inyección de depósito. En determinadas realizaciones, también se puede utilizar ácido hialurónico, que tiene el efecto de fomentar una duración sostenida en la circulación.

En determinadas realizaciones, se pueden utilizar dispositivos de suministro de fármacos implantables para introducir la construcción de anticuerpo deseada.

Composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican la construcción de anticuerpos de la invención en formulaciones de administración / liberación sostenida o controlada. Los expertos en la técnica también conocen técnicas para formular una diversidad de otros medios de suministro sostenido o controlado, tales como soportes de liposomas, micropartículas bio-erosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US93/00829, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para el suministro de composiciones farmacéuticas. Preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos moldeados, p. ej., películas o microcápsulas. Matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (tal como se describe en la Pat. de EE.UU. N° 3.773.919 y la Publicación de Solicitud de Patente Europea N° EP 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 y Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etileno y acetato de vinilo (Langer et al., 1981, *supra*) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (Publicación de Solicitud de Patente Europea N° EP 133.988). Composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; Publicaciones de Solicitud de Patente Europea N°s EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico también se puede atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones,

nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Técnicas de este tipo se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Las composiciones farmacéuticas utilizadas para la administración *in vivo* se proporcionan típicamente en forma de preparaciones estériles. La esterilización se puede lograr mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización utilizando este método puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. Composiciones para administración parenteral se pueden almacenar en forma liofilizada o en solución. Composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene una lumbrera de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Otro aspecto de la invención incluye la construcción de anticuerpos auto-tamponadores de las formulaciones de la invención, que pueden utilizarse como composiciones farmacéuticas, como se describe en la solicitud de patente internacional WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599). Hay disponible una diversidad de exposiciones sobre materiales y métodos de formulación y estabilización de proteínas útiles a este respecto, tales como Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" en: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter y Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002) y Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), véanse particularmente las partes pertinentes a los excipientes y procedimientos de los mismos para formulaciones de proteínas auto-tamponadoras de acuerdo con la presente invención, especialmente en lo que respecta a productos y procedimientos farmacéuticos de proteínas para usos veterinarios y/o médicos humanos.

Salas se pueden utilizar de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención para, por ejemplo, ajustar la fuerza iónica y/o la isotonicidad de una formulación y/o para mejorar la solubilidad y/o estabilidad física de una proteína u otro ingrediente de una composición de acuerdo con la invención. Como es bien sabido, los iones pueden estabilizar el estado nativo de las proteínas uniéndose a residuos cargados en la superficie de la proteína y protegiendo a los grupos cargados y polares en la proteína y reduciendo la fuerza de sus interacciones electrostáticas, atractivas y repelentes. Los iones también pueden estabilizar el estado desnaturalizado de una proteína uniéndose, en particular, a los enlaces peptídicos desnaturalizados (--CONH) de la proteína. Además, la interacción iónica con grupos cargados y polares en una proteína también puede reducir las interacciones electrostáticas intermoleculares y, con ello, prevenir o reducir la agregación e insolubilidad de las proteínas.

Las especies iónicas difieren significativamente en sus efectos sobre las proteínas. Se ha desarrollado un cierto número de clasificaciones categóricas de iones y sus efectos sobre las proteínas que pueden utilizarse en la formulación de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. Un ejemplo es la serie Hofmeister, que clasifica los solutos iónicos y no iónicos polares por su efecto sobre la estabilidad conformacional de las proteínas en solución. Los solutos estabilizadores se denominan "cosmotrópicos". Los solutos desestabilizadores se denominan "caotrópicos". Los cosmótopos se utilizan comúnmente en concentraciones elevadas (p. ej., sulfato de amonio > 1 molar) para precipitar proteínas de la solución ("precipitación salina"). Los caótopos se utilizan comúnmente para dentaduras postizas y/o para solubilizar proteínas ("salazón"). La efectividad relativa de los iones para "salar" y "precipitar" define su posición en la serie de Hofmeister.

Los aminoácidos libres se pueden utilizar en la construcción de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de las formulaciones de la invención de acuerdo con diversas realizaciones de la invención como agentes de carga, estabilizadores y antioxidantes, así como otros usos estándares. Se pueden utilizar lisina, prolina, serina y alanina para estabilizar proteínas en una formulación. La glicina es útil en la liofilización para asegurar la estructura y propiedades correctas de la torta. La arginina puede ser útil para inhibir la agregación de proteínas, tanto en formulaciones líquidas como liofilizadas. La metionina es útil como un antioxidante.

Polioles incluyen azúcares, p. ej., manitol, sacarosa y sorbitol y alcoholes polihídricos, tales como, por ejemplo, glicerol y propilenglicol y, para los propósitos de la discusión en esta memoria, polietilenglicol (PEG) y sustancias relacionadas. Los polioles son cosmotrópicos. Son agentes estabilizantes útiles en formulaciones tanto líquidas como liofilizadas para proteger proteínas de los procesos de degradación física y química. Polioles también son útiles para ajustar la tonicidad de las formulaciones. Entre los polioles útiles en realizaciones seleccionadas de la invención se encuentra el manitol, comúnmente utilizado para asegurar la estabilidad estructural de la torta en formulaciones liofilizadas. Asegura estabilidad estructural a la torta. Generalmente se utiliza con un lioprotector, p. ej., sacarosa. El sorbitol y la sacarosa se encuentran entre los agentes preferidos para ajustar la tonicidad y como estabilizadores para proteger frente a las tensiones de congelación-descongelación durante el transporte o la preparación de cargas durante el procedimiento de fabricación. Los azúcares reductores (que contienen grupos aldehído o cetona libres), tales como glucosa y lactosa, pueden glicar los residuos de lisina y arginina de la superficie. Por lo tanto, generalmente no se encuentran entre los polioles preferidos para uso de acuerdo con la invención. Además, los azúcares que forman especies reactivas de este tipo, tales como sacarosa, que se hidroliza a fructosa y glucosa en condiciones ácidas y, en consecuencia, engendra glicación, tampoco se encuentran entre los polioles preferidos de la invención a este respecto. El PEG es útil para estabilizar proteínas y como un crioprotector y puede utilizarse en la invención a este respecto.

Realizaciones de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de las formulaciones de la invención comprenden, además, tensioactivos. Las moléculas de proteína pueden ser susceptibles a la adsorción sobre superficies y a la desnaturalización y la consiguiente agregación en las interfaces aire-líquido, sólido-líquido y líquido-líquido. Estos efectos se incrementan generalmente a la inversa con la concentración de las proteínas. Estas interacciones deletéreas se incrementan generalmente a la inversa con la concentración de proteína y típicamente son exacerbadas por la agitación física, tales como la generada durante el transporte y la manipulación de un producto. Los tensioactivos se utilizan de forma rutinaria para prevenir, minimizar o reducir la adsorción superficial. Tensioactivos útiles en la invención a este respecto incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitán y poloxámero 188. Los tensioactivos también se utilizan comúnmente para controlar la estabilidad conformacional de las proteínas. El uso de tensioactivos a este respecto es específico para proteínas, ya que cualquier tensioactivo dado estabilizará típicamente algunas proteínas y desestabilizará otras.

Los polisorbatos son susceptibles a la degradación oxidativa y, a menudo, tal como se suministran, contienen cantidades suficientes de peróxidos para provocar la oxidación de las cadenas laterales de residuos de proteínas, especialmente metionina. En consecuencia, los polisorbatos deberían utilizarse con cuidado y, cuando se utilizan, deben emplearse en su concentración efectiva más baja. A este respecto, los polisorbatos ejemplifican la regla general de que los excipientes deben utilizarse en sus concentraciones efectivas más bajas.

Realizaciones de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de las formulaciones de la invención comprenden uno o más antioxidantes. Hasta cierto punto, la oxidación perjudicial de proteínas se puede prevenir en las formulaciones farmacéuticas manteniendo niveles adecuados de oxígeno y temperatura ambientales y evitando la exposición a la luz. También se pueden utilizar excipientes antioxidantes para prevenir la degradación oxidativa de proteínas. Entre los antioxidantes útiles a este respecto se encuentran los agentes reductores, los captadores de oxígeno/radicales libres y los agentes quelantes. Antioxidantes para uso en formulaciones de proteínas terapéuticas de acuerdo con la invención son preferiblemente hidrosolubles y mantienen su actividad durante la vida útil de un producto. EDTA es un antioxidante preferido de acuerdo con la invención a este respecto. Los antioxidantes pueden dañar las proteínas. Por ejemplo, agentes reductores, tales como glutatión en particular, pueden alterar los enlaces disulfuro intramoleculares. Por lo tanto, los antioxidantes para uso en la invención se seleccionan para, entre otras cosas, eliminar o reducir suficientemente la posibilidad de que ellos mismos dañen las proteínas en la formulación.

Formulaciones de acuerdo con la invención pueden incluir iones metálicos que son cofactores de proteínas y que son necesarios para formar complejos de coordinación de proteínas tales como el zinc necesario para formar determinadas suspensiones de insulina. Los iones metálicos también pueden inhibir algunos procesos que degradan proteínas. Sin embargo, los iones metálicos también catalizan procesos físicos y químicos que degradan proteínas. Se pueden utilizar iones magnesio (10-120 mM) para inhibir la isomerización del ácido aspártico a ácido isoaspártico. Los iones Ca^{+2} (hasta 100 mM) pueden aumentar la estabilidad de la desoxirribonucleasa humana. Sin embargo, Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} pueden desestabilizar la rhDNasa. De manera similar, Ca^{+2} y Sr^{+2} pueden estabilizar el Factor VIII, éste puede ser desestabilizado por Mg^{+2} , Mn^{+2} and Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+2} , y su agregación puede incrementarse por los iones Al^{+3} .

Realizaciones de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de las formulaciones de la invención comprenden, además, uno o más conservantes. Los conservantes son necesarios cuando se desarrollan formulaciones parenterales multidosis que implican más de una extracción del mismo recipiente. Su función principal es inhibir el crecimiento microbiano y asegurar la esterilidad del producto durante la vida útil o el período de uso del producto farmacológico. Los conservantes de uso común incluyen alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes tienen una larga historia de uso con parenterales de moléculas pequeñas, el desarrollo de formulaciones de proteínas que incluyan conservantes puede ser un desafío. Los conservantes tienen casi siempre un efecto desestabilizador (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor importante para limitar su uso en formulaciones de proteínas multidosis. Hasta la fecha, la mayoría de los fármacos proteicos se han formulado para un solo uso. Sin embargo, cuando son posibles formulaciones de dosis múltiples, tienen la ventaja adicional de permitir la conveniencia del paciente y una comerciabilidad incrementada. Un buen ejemplo es el de la hormona del crecimiento humana (hGH), en donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha conducido a la comercialización de presentaciones de pluma inyectable multiusos más convenientes. Actualmente, se encuentran disponibles en el mercado al menos cuatro de estos dispositivos de pluma que contienen formulaciones conservadas de hGH. Norditropin (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ (líquido, Genentech) y Genotropin (liofilizado - cartucho de doble cámara, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol, mientras que Somatropo (Eli Lilly) está formulado con m-cresol. Es necesario considerar varios aspectos durante la formulación y el desarrollo de formas de dosificación conservadas. Debe optimizarse la concentración eficaz de conservante en el producto farmacológico. Esto requiere testar un conservante dado en la forma de dosificación con intervalos de concentraciones que confieren eficacia antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de la proteína.

Como era de esperar, el desarrollo de formulaciones líquidas que contienen conservantes es más desafiante que las formulaciones liofilizadas. Productos liofilizados pueden liofilizarse sin el conservante y pueden reconstituirse con un diluyente que contenga conservante en el momento de su uso. Esto acorta el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con la proteína, minimizando significativamente los riesgos de estabilidad asociados. Con las formulaciones líquidas, la eficacia y la estabilidad de los conservantes deben mantenerse durante toda la vida útil del

producto (aproximadamente de 18 a 24 meses). Un punto importante a tener en cuenta es que la eficacia del conservante debe demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes del excipiente.

5 Las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos descritas en esta memoria también pueden formularse como inmuno-liposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para el suministro de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen la construcción de anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, como se describe en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Pat. de EE.UU. N°s 4.485.045 y 4.544.545; y documento WO 97/38731. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.013.556. Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Fragmentos Fab' de la construcción de anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente, el liposoma contiene un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

20 Una vez formulada la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles en forma de una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, cristal o en forma de un polvo deshidratado o liofilizado. Formulaciones de este tipo se pueden almacenar en una forma lista para usar o en una forma (p. ej., liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

25 La actividad biológica de la composición farmacéutica definida en esta memoria puede determinarse, por ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad, como se describe en los siguientes ejemplos, en el documento WO 99/54440 o por Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). "Eficacia" o "eficacia *in vivo*", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la respuesta a la terapia por la composición farmacéutica de la invención, utilizando, p. ej., criterios de respuesta estandarizados del NCI. El éxito o la eficacia *in vivo* de la terapia utilizando una composición farmacéutica de la invención se refiere a la eficacia de la composición para su propósito pretendido, *es decir*, la capacidad de la composición para provocar el efecto deseado, es decir, el agotamiento de células patológicas, p. ej. células tumorales. La eficacia *in vivo* puede vigilarse mediante métodos estándares establecidos para las entidades patológicas respectivas que incluyen, pero no se limitan a recuentos de glóbulos blancos, diferenciales, clasificación de células activadas por fluorescencia, aspiración de médula ósea. Además, se pueden utilizar diversos parámetros químicos clínicos específicos de la enfermedad y otros métodos estándares establecidos. Además, la tomografía asistida por computadora, los rayos X, la tomografía por resonancia magnética nuclear (p. ej., para la evaluación de la respuesta basada en los criterios del Instituto Nacional del Cáncer) [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Informe de un taller internacional para estandarizar los criterios de respuesta para los linfomas no Hodgkin. Grupo de trabajo internacional patrocinado por NCI. J Clin Oncol. abril de 1999;17(4):1244], tomografía por emisión de positrones, recuentos de glóbulos blancos, diferenciales, clasificación de células activadas por fluorescencia, aspiración de médula ósea, biopsias/histologías de ganglios linfáticos y se pueden utilizar diversos parámetros de química clínica específicos del linfoma (p. ej., lactato deshidrogenasa) y otros métodos estándares establecidos.

45 Otro desafío importante en el desarrollo de fármacos tales como la composición farmacéutica de la invención es la modulación predecible de las propiedades farmacocinéticas. Para este fin, se puede establecer un perfil farmacocinético del fármaco candidato, es decir, un perfil de los parámetros farmacocinéticos que afectan la capacidad de un fármaco particular para tratar una afección determinada. Parámetros farmacocinéticos del fármaco que influyen en la capacidad de un fármaco de tratar una determinada enfermedad incluyen, pero no se limitan a: semivida, volumen de distribución, metabolismo hepático de primer paso y grado de unión al suero sanguíneo. La eficacia de un agente farmacológico dado puede verse influida por cada uno de los parámetros arriba mencionados.

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

Los parámetros farmacocinéticos también incluyen biodisponibilidad, tiempo de retardo (Tlag), Tmáx, tasas de absorción, mayor inicio y/o C_{máx} para una cantidad dada de fármaco administrado. "Biodisponibilidad" significa la cantidad de un fármaco en el compartimiento sanguíneo. "Tiempo de espera" significa el tiempo de demora entre la administración del fármaco y su detección y mensurabilidad en sangre o plasma. "Tmáx" es el tiempo después del

cual se alcanza la concentración sanguínea máxima del fármaco, y "C_{máx}" es la concentración sanguínea máxima obtenida con un fármaco dado. El tiempo necesario para alcanzar la concentración sanguínea o tisular del fármaco que se requiere para su efecto biológico está influenciado por todos los parámetros. Los parámetros farmacocinéticos de construcciones de anticuerpos biespecíficos que exhiben especificidad de especies cruzadas, que pueden determinarse en ensayos preclínicos con animales en primates que no son chimpancés como se describe arriba, también se recogen, p. ej., en la publicación de Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12).

En una realización, la invención proporciona la construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla de la invención o la construcción de anticuerpo producida de acuerdo con el procedimiento de la invención para uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de un cáncer.

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

El término "mejoría", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier mejora del estado de la enfermedad de un paciente que tiene uno de los tipos de tumores o cánceres (metastásicos) como se especifica en esta memoria, mediante la administración de una construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla de acuerdo con la invención para un sujeto que lo necesite. Una mejora de este tipo también puede verse como una ralentización o detención de la progresión del tumor o cáncer (metastásico) del paciente. El término "prevención", tal como se utiliza en esta memoria, significa evitar la aparición o re-aparición de un paciente que tiene uno de los tipos de tumores o cánceres (metastásicos) que se especifican en esta memoria, mediante la administración de una construcción de anticuerpo de acuerdo con la invención a un sujeto que lo necesite.

El término "enfermedad" se refiere a cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con la construcción de anticuerpo o la composición farmacéutica descrita en esta memoria. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicos y agudos, incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero a la enfermedad en cuestión.

Una "neoplasia" es un crecimiento anormal de tejido que, por lo general, pero no siempre, forma una masa. Cuando también forma una masa, se la alude comúnmente como un "tumor". Las neoplasias o tumores pueden ser benignos, potencialmente malignos (precancerosos) o malignos. Las neoplasias malignas se denominan comúnmente cáncer. Por lo general, invaden y destruyen el tejido circundante y pueden formar metástasis, es decir, se diseminan a otras partes, tejidos u órganos del cuerpo. Por lo tanto, la expresión "cáncer metastásico" abarca metástasis a otros tejidos u órganos distintos del tumor original. Los linfomas y las leucemias son neoplasias linfoides.

Para los fines de la presente invención, también están abarcados por los términos "tumor" o "cáncer".

En una realización preferida, la invención proporciona la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención o la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico producida de acuerdo con el procedimiento de la invención para uso en la prevención, el tratamiento o la mejoría de un cáncer, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de pulmón, carcinoma de cabeza y cuello, un tumor primario o secundario del SNC, un tumor cerebral primario o secundario, linfoma primario del SNC, tumores del eje medular, glioma del tronco encefálico, glioblastoma, adenoma hipofisario, cáncer adrenocortical, carcinoma de esófago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de ovario, NSCLC (siglas inglesas de cáncer de pulmón de células no pequeñas), SCLC (siglas inglesas de cáncer de pulmón de células pequeñas), cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, carcinoma de células de transición, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer hepático, cáncer de las vías biliares, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal (gástrico, colorrectal y duodenal), cáncer del intestino delgado, cáncer del tracto biliar, cáncer de la uretra, carcinoma de células renales, carcinoma del endometrio, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer cutáneo de células escamosas, melanoma, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, osteosarcoma, mesotelioma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas linfocíticos, mieloma múltiple, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma y sarcoma de tejidos blandos, y una enfermedad de cáncer metastásico derivada de cualquiera de los anteriores. El cáncer (metastásico) es preferiblemente un cáncer positivo para cadherina P o que expresa cadherina P.

En una realización preferida adicional, la invención proporciona la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención o la construcción de anticuerpo producida de acuerdo con el procedimiento de la invención para uso en la prevención, el tratamiento o la mejoría de un cáncer, en donde el cáncer es un carcinoma de células escamosas (metastásico).

Las expresiones "sujeto que lo necesita" o "que necesita tratamiento" incluyen aquellos que ya padecen el trastorno, así como aquellos en los que se debe prevenir el trastorno. El sujeto necesitado o "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención se diseñará generalmente para vías y métodos de administración específicos, para dosis y frecuencias de administración específicas, para tratamientos específicos de enfermedades específicas, con intervalos de biodisponibilidad y persistencia, entre otras cosas. Los materiales de la composición se formulan preferiblemente en concentraciones que son aceptables para el lugar de administración.

Por lo tanto, las formulaciones y composiciones pueden diseñarse de acuerdo con la invención para suministro mediante cualquier vía de administración adecuada. En el contexto de la presente invención, las vías de administración incluyen, pero no se limitan a

- vías tópicas (tales como epicutánea, inhalatoria, nasal, oftálmica, auricular/aural, vaginal, mucosal);
- vías enterales (tales como oral, gastrointestinal, sublingual, sublabial, bucal, rectal); y
- vías parenterales (tales como intravenosa, intraarterial, intraósea, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular, epidural, intratecal, subcutánea, intraperitoneal, extra-amniótica, intraarticular, intracardíaca, intradérmica, intralesional, intrauterina, intravesical, intravítrea, transdérmica, intranasal, transmucosal, intrasínovial, intraluminal).

Las composiciones farmacéuticas y la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de esta invención son particularmente útiles para la administración parenteral, p. ej., el suministro subcutáneo o intravenoso, por ejemplo mediante inyección tal como inyección en bolo, o mediante infusión tal como infusión continua. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar utilizando un dispositivo médico. Se describen ejemplos de dispositivos médicos para administrar composiciones farmacéuticas en las Patentes de EE.UU. N°S 4.475.196; 4.439.196; 4.447.224; 4.447.233; 4.486.194; 4.487.603; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 5.064.413; 5.312.335; 5.312.335; 5.383.851; y 5.399.163.

En particular, la presente invención proporciona una administración ininterrumpida de la composición adecuada. Como un ejemplo no limitativo, la administración ininterrumpida o sustancialmente ininterrumpida, *es decir*, continua puede realizarse mediante un pequeño sistema de bomba que lleva el paciente para medir la entrada de agente terapéutico en el cuerpo del paciente. La composición farmacéutica que comprende la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención se puede administrar utilizando dichos sistemas de bomba. Sistemas de bomba de este tipo son generalmente conocidos en la técnica y comúnmente se basan en el intercambio periódico de cartuchos que contienen el agente terapéutico que se ha de infundir. Cuando se cambia el cartucho en un sistema de bomba de este tipo, puede producirse una interrupción temporal del flujo ininterrumpido de otro modo de agente terapéutico en el cuerpo del paciente. En tal caso, la fase de administración antes del reemplazo del cartucho y la fase de administración después del reemplazo del cartucho aún se considerarían dentro del significado de los medios farmacéuticos y los métodos de la invención juntos constituyen una "administración ininterrumpida" de un agente terapéutico de este tipo.

La administración continua o ininterrumpida de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de la invención puede ser intravenosa o subcutánea por medio de un dispositivo de suministro de fluidos o un pequeño sistema de bomba que incluye un mecanismo de conducción de fluidos para sacar el fluido de un depósito y un mecanismo de accionamiento para accionar el mecanismo de conducción. Sistemas de bomba para administración subcutánea pueden incluir una aguja o una cánula para penetrar la piel de un paciente y administrar la composición adecuada al cuerpo del paciente. Dichos sistemas de bomba pueden fijarse o adherirse directamente a la piel del paciente independientemente de una vena, arteria o vaso sanguíneo, permitiendo con ello un contacto directo entre el sistema de bomba y la piel del paciente. El sistema de bomba se puede colocar en la piel del paciente durante 24 horas hasta varios días. El sistema de bomba puede ser de pequeño tamaño con un depósito para pequeños volúmenes. Como un ejemplo no limitativo, el volumen del depósito para la composición farmacéutica adecuada a administrar puede estar entre 0,1 y 50 ml.

La administración continua también puede ser transdérmica mediante un parche que se coloca sobre la piel y se reemplaza a intervalos. Un experto en la técnica conoce los sistemas de parches para el suministro de fármacos adecuados para este propósito. Cabe señalar que la administración transdérmica es especialmente adecuada para la administración ininterrumpida, ya que el intercambio de un primer parche agotado se puede realizar ventajosamente simultáneamente con la colocación de un segundo parche nuevo, por ejemplo, en la superficie de la piel inmediatamente adyacente al primer parche agotado e inmediatamente antes de retirar el primer parche agotado. No surgen problemas de interrupción del flujo o fallo de la celda de energía.

Si la composición farmacéutica se ha liofilizado, el material liofilizado se reconstituye primero en un líquido apropiado antes de la administración. El material liofilizado se puede reconstituir en, p. ej., agua bacteriostática para inyección

(BWFI), solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o la misma formulación en la que había estado la proteína antes de la liofilización.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada que se puede determinar, p. ej., mediante estudios de aumento de la dosis mediante la administración de dosis crecientes de la construcción de anticuerpo de la invención que exhibe la especificidad entre especies descrita en esta memoria para primates que no son chimpancés. por ejemplo macacos. Como se expuso arriba, la construcción de anticuerpo de la invención que exhibe especificidad entre especies descrita en esta memoria puede utilizarse ventajosamente en forma idéntica en pruebas preclínicas en primates que no son chimpancés y como fármaco en seres humanos. El régimen de dosificación lo determinará el médico tratante y los factores clínicos. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, la superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se ha de administrar, el sexo, la hora y la vía de administración, la salud general y otros. fármacos que se administran al mismo tiempo.

La expresión "dosis eficaz" o "dosificación eficaz" se define como una cantidad suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el efecto deseado. La expresión "dosis terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Cantidades o dosis eficaces para este uso dependerán de la afección a tratar (la indicación), la construcción del anticuerpo administrado, el contexto y los objetivos terapéuticos, la gravedad de la enfermedad, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al agente terapéutico, la vía de administración, el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o el estado (la edad y salud general) del paciente, y el estado general del sistema inmune del propio paciente. La dosis adecuada se puede ajustar de acuerdo con el criterio del médico tratante, de modo que se pueda administrar al paciente una vez o durante una serie de administraciones, y con el fin de obtener el efecto terapéutico óptimo.

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

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de la invención preferiblemente da como resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia o duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o discapacidad debido a la aflicción de la enfermedad. Para tratar tumores que expresan CDH3, una cantidad terapéuticamente eficaz de la construcción de anticuerpos de la invención, p. ej., una construcción de anticuerpos anti-CDH3/anti-CD3, inhibe preferiblemente el crecimiento celular o el crecimiento del tumor en al menos 20 %, al menos 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 % o al menos aproximadamente 90 % en relación con los pacientes no tratados. La capacidad de un compuesto de inhibir el crecimiento del tumor puede evaluarse en un modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos.

La composición farmacéutica se puede administrar como un único agente terapéutico o en combinación con terapias adicionales tales como terapias contra el cáncer según sea necesario, p. ej., otros fármacos proteicos y no proteicos. Estos fármacos pueden administrarse simultáneamente con la composición que comprende la construcción de anticuerpo de la invención como se define en esta memoria o por separado antes o después de la administración de dicha construcción de anticuerpo en intervalos y dosis definidos oportunamente.

La expresión "dosis eficaz y no tóxica", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una dosis tolerable de una construcción de anticuerpo de la invención que es lo suficientemente alta como para provocar el agotamiento de las células patológicas, la eliminación del tumor, la reducción del tumor o la estabilización de la enfermedad sin o esencialmente sin efectos tóxicos importantes. Dosis eficaces y no tóxicas de este tipo pueden determinarse, p. ej., mediante estudios de aumento de la dosis descritos en la técnica y deben estar por debajo de la dosis que induce efectos secundarios adversos graves (toxicidad limitante de la dosis, DLT).

El término "toxicidad", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a los efectos tóxicos de un fármaco que se manifiestan en eventos adversos o eventos adversos graves. Estos eventos secundarios pueden referirse a una falta de tolerabilidad del fármaco en general y/o una ausencia de tolerancia local después de la administración. La toxicidad también podría incluir efectos teratogénicos o cancerígenos provocados por el fármaco.

El término "seguridad", la expresión "seguridad *in vivo*" o el término "tolerabilidad", tal como se utiliza en esta memoria define la administración de un fármaco sin inducir eventos adversos graves directamente después de la administración (tolerancia local) y durante un período más largo de aplicación del fármaco. "Seguridad", "seguridad *in vivo*" o "tolerabilidad" pueden evaluarse, p. ej., a intervalos regulares durante el tratamiento y el período de seguimiento. Las mediciones incluyen evaluación clínica, p. ej., manifestaciones orgánicas y rastreo de anomalías de laboratorio. Se puede llevar a cabo una evaluación clínica y desviaciones de los hallazgos normales se pueden registrar/codificar de acuerdo con los estándares NCI-CTC y/o MedDRA. Las manifestaciones de órganos pueden incluir criterios tales

como alergia/inmunología, sangre/médula ósea, arritmia cardíaca, coagulación y similares, como se recoge, p. ej., en los Criterios de Terminología Común para eventos adversos v3.0 (CTCAE). Parámetros de laboratorio que pueden testarse incluyen, por ejemplo, hematología, química clínica, perfil de coagulación y análisis de orina y examen de otros fluidos corporales, tales como suero, plasma, líquido linfático o cefalorraquídeo, líquido y similares. Por lo tanto, la seguridad puede evaluarse, p. ej., mediante examen físico, técnicas de formación de imágenes (es decir, ultrasonidos, rayos X, tomografías computarizadas, formación de imágenes por Resonancia Magnética (MRI), otras medidas con dispositivos técnicos (es decir, electrocardiograma), signos vitales, midiendo parámetros de laboratorio y registrando efectos adversos. Por ejemplo, eventos adversos en primates no chimpancés en los usos y métodos de acuerdo con la invención pueden examinarse mediante métodos histopatológicos y/o histoquímicos.

Las expresiones y los términos anteriores también se mencionan, p. ej., en la Evaluación de seguridad preclínica de productos farmacéuticos derivados de la biotecnología S6; Directrices Tripartitas Armonizadas de la ICH; Reunión del Comité Directivo de ICH el 16 de julio de 1997.

En una realización adicional, la invención proporciona un kit que comprende una construcción de anticuerpo biespecífico de cadena sencilla de la invención, una construcción de anticuerpo producida de acuerdo con el procedimiento de la invención, un vector de la invención y/o una célula huésped de la invención.

En el contexto de la presente invención, el término "kit" significa dos o más componentes, uno de los cuales corresponde a la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico, la composición farmacéutica, el vector o la célula huésped de la invención - empaquetados juntos en un envase, recipiente o de otro modo. Por lo tanto, un kit puede describirse como un conjunto de productos y/o utensilios que son suficientes para lograr un determinado objetivo, que pueden comercializarse como una sola unidad.

El kit puede comprender uno o más recipientes (tales como viales, ampollas, recipientes, jeringas, botellas, bolsas) de cualquier forma, tamaño y material apropiados (preferiblemente impermeables, p. ej., de plástico o vidrio) que contienen la construcción de anticuerpo o la composición farmacéutica del presente invención en una dosificación adecuada para su administración (véase más arriba). El kit puede contener adicionalmente instrucciones de uso (p. ej., en forma de folleto o manual de instrucciones), medios para administrar la construcción de anticuerpos de la presente invención, tal como una jeringa, bomba, infusor o similar, medios para reconstituir la construcción de anticuerpos de la invención y/o medios para diluir la construcción de anticuerpos de la invención.

La invención también proporciona kits para una unidad de administración de dosis única. El kit de la invención también puede contener un primer recipiente que comprende una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico seca/liofilizada y un segundo recipiente que comprende una formulación acuosa. En determinadas realizaciones de esta invención, se proporcionan kits que contienen jeringas pre-cargadas de una sola cámara y de múltiples cámaras (p. ej., jeringas líquidas y liojeringas).

Las Figuras muestran:

Figura 1:

Representación esquemática de los cinco dominios extracelulares D1-D5 de CDH3 humana, de CDH3 murina y de una CDH3 quimérica ejemplar (aquí: "D1B murina"). Más adelante se muestran nuevamente los cinco dominios y, además, su división en tres sub-dominios cada uno. La interpretación de una señal FACS ejemplar (véase "agrupación de epítomos" en el Ejemplo 2) se muestra en la parte inferior derecha.

Figura 2:

Alineamiento de secuencias de CDH3 humana y CDH3 murina e indicación ejemplar de los diferentes dominios: péptido señal, pro-péptido, dominios extracelulares D1-D5, dominio transmembrana y dominio citoplasmático. Se introdujeron intercambios de secuencias murinas de los cinco dominios extracelulares en la cadena principal de CDH3 humana, véase el Ejemplo 1, y luego se utilizaron las construcciones quiméricas para la agrupación de epítomos (mapeo de epítomos), véase el Ejemplo 2.

Figura 3:

CDH3 humana y murina, así como 20 construcciones quiméricas de CDH3 humana-murina (cinco dominios extracelulares (ECD) y tres sub-dominios para cada uno de los ECD) expresadas en la superficie de células CHO como se muestra por citometría de flujo. La expresión de CDH3 de tipo salvaje humana, CDH3 de tipo salvaje murina y de las construcciones de CDH3 quiméricas en células CHO se verificó con un anticuerpo IgG1 de ratón monoclonal anti-CDH3 humana que tiene reactividad cruzada murina. El anticuerpo monoclonal unido se detectó con una IgG anti-ratón Fcy-PE (1:100, 50 µl; Jackson Immunoresearch nº 115-116-071). D1*): Hu CDH3 D1 mu-CHO.

Figura 4:

Mapeo de epítomos de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de CDH3. Ejemplos de moléculas de unión específicas para diferentes agrupaciones de epítomos / sub-dominios extracelulares, detectados mediante el mapeo de epítomos de las construcciones quiméricas de CDH3, véase el Ejemplo 2. **Figura 4A:** Aglutinantes de D1B. **Figura 4B:** Aglutinantes de D2C. **Figura 4C:** Aglutinantes de D3A.

Figura 5:

Análisis de unión FACS de 5 µg/mL de monómero de construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico purificado en las líneas celulares indicadas. Véase también el Ejemplo 5. La detección de la unión de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3 se llevó a cabo con un anticuerpo de ratón interno específico para la parte de unión a CD3 del anticuerpo biespecífico, seguido de Fcy-PE anti-ratón de cabra. El control negativo fue solo tampón, seguido de anticuerpos de detección.

Figura 5A y 5B:

Construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 (**Figura 5A:** agrupación de epítomos / sub-dominio extracelular D2C; **Figura 5B:** agrupación de epítomos / sub-dominio extracelular D3A) se analizaron para determinar su unión a células CHO transfectadas con CDH3 humana, CD3 humana en la línea de células T humana HPB-all, células CHO transfectadas con CDH3 de cyno, CD3 de cyno en la línea de células T que expresan cyno CD3 HSC-F, línea celular A431 positiva para CDH3 humana y células CHO transfectadas con CDH3 murina (control negativo). La unión se detectó en todos los casos, excepto en el control negativo.

Figura 5C y 5D:

Construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 (**Figura 5C:** agrupación de epítomos/sub-dominio extracelular D2C; **Figura 5D:** agrupación de epítomos / sub-dominio extracelular D3A) se analizaron para determinar su unión a parálogos CDH1, CDH2, CDH4 y CDH5 de CDH3 humana. No se detectó unión a los parálogos. No se detectó unión a células CHO dhfr^{-/-} (control negativo).

Figura 6:

Actividad citotóxica de células T CD8+ humanas estimuladas contra células CHO transfectadas con CDH3 humana en presencia de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 medida en un ensayo de liberación de ⁵¹cromo de 18 horas. Células efectoras: células T CD8+ humanas enriquecidas estimuladas. Células diana: células CHO transfectadas con CDH3 humana. Relación de células efectoras a dianas (E:T): 10:1. Anticuerpos específicos para la agrupación de epítomos / sub-dominio extracelular D2C (**Figura 6A**) y D3A (**Figura 6B**).

Figura 7:

Actividad citotóxica de células T CD8+ humanas estimuladas contra la línea celular A431 de carcinoma epidermoide positivo para CDH3 humana en presencia de anticuerpos biespecíficos CDH3xCD3 medida en un ensayo de liberación de ⁵¹cromo de 18 horas. Células efectoras: células T CD8+ humanas enriquecidas estimuladas. Células diana: células A431 humanas. Relación de células efectoras a dianas (E:T): 10:1. Construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos para la agrupación de epítomos / sub-dominio extracelular D2C (**Figura 7A**) y D3A (**Figura 7B**).

Figura 8:

Actividad citotóxica de células PBMC humanas no estimuladas contra células CHO transfectadas con CDH3 humana en presencia de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 medida en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas. Células efectoras: PBMC humanas no estimuladas (CD14-/CD56-). Células diana: células CHO transfectadas con CDH3 humana. Relación de células efectoras a dianas (E:T): 10:1. Anticuerpos específicos para la agrupación de epítomos / sub-dominio extracelular D2C (**Figura 8A**) y D3A (**Figura 8B**).

Figura 9:

Actividad citotóxica de PBMC humanas no estimuladas contra la línea celular A431 de carcinoma epidermoide positivo para CDH3 humana en presencia de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 medida en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas. Células efectoras: PBMC humanas no estimuladas (CD14-/CD56-). Células diana: células A431 humanas. Relación de células efectoras

a dianas (E:T): 10:1. Anticuerpos específicos para la agrupación de epítomos / sub-dominio extracelular D2C (**Figura 9A**) y D3A (**Figura 9B**).

Figura 10:

Actividad citotóxica de una línea de células T de macaco contra células CHO transfectadas con CDH3 de macaco en presencia de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 medida en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas. Células efectoras: línea de células T CD3 positivas de macaco LnPx4119. Células diana: células CHO transfectadas con CDH3 de macaco. Relación de células efectoras a dianas (E:T): 10:1. Construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos para la agrupación de epítomos / sub-dominio extracelular D2C (**Figura 10A**), D3A (**Figura 10B**) y D1B (**Figura 10C**).

Figura 11:

Actividad antitumoral de una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3 de la agrupación de epítomos / sub-dominio extracelular D2C (CDH3-13) en un modelo de xenoinjerto de tumor humano (véase el Ejemplo 14). El anticuerpo previene, de forma dependiente de la dosis, la formación de tumores A-431 en presencia de PBMCs humanas. Alto volumen tumoral al inicio de la medición (Día 5) debido al gran volumen de mezcla celular inyectado el Día 1. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Figura 12:

Actividad antitumoral de una construcción de anticuerpo de cadena sencilla CDH3xCD3 biespecífico y de semivida prolongada (HLE, por sus siglas en inglés) de la agrupación de epítomos / sub-dominio extracelular D2C (CDH3-13) en un modelo de xenoinjerto de tumor humano (véase el Ejemplo 15). El anticuerpo HLE previene, de forma dependiente de la dosis, la formación de tumores HCT-116 en presencia de PBMCs humanas. Mientras que la Figura 12 A muestra el resultado general, la Figura 12 B diferencia el resultado obtenido para la mayor concentración de anticuerpos (grupo 2) en animales que respondieron (7/10) y animales que no respondieron (3/10).

Figura 13:

Activación de células T en ausencia de células diana con construcciones de anticuerpos biespecíficos en ausencia (panel superior) y presencia (panel inferior) de una fusión de albúmina en el extremo C de la construcción.

Ejemplos:

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

Generación de células CHO que expresan CDH3 de tipo salvaje y quimérica

Para la construcción de las moléculas quiméricas utilizadas para el mapeo de epítomos, la secuencia de los respectivos cinco dominios extracelulares Dom1 a Dom5 (o D1 a D5) y de sus sub-dominios (A, B y C) de CDH3 humana fue reemplazada por la correspondiente secuencia murina. Se generaron las siguientes 20 moléculas; véanse también las Figuras 1 y 2:

• CDH3 Hu / Dom1 mu (aa 108-215)	SEQ ID NO: 13
◦ CDH3 Hu / Dom1A mu (aa 108-143)	SEQ ID NO: 14
◦ CDH3 Hu / Dom1B mu (aa 144-179)	SEQ ID NO: 15
◦ CDH3 Hu / Dom1C mu (aa 180-215)	SEQ ID NO: 16
• CDH3 Hu / Dom2 mu (aa 216-327)	SEQ ID NO: 17
◦ CDH3 Hu / Dom2A mu (aa 216-252)	SEQ ID NO: 18
◦ CDH3 Hu / Dom2B mu (aa 253-290)	SEQ ID NO: 19
◦ CDH3 Hu / Dom2C mu (aa 291-327)	SEQ ID NO: 20
• CDH3 Hu / Dom3 mu (aa 328-440)	SEQ ID NO: 21
◦ CDH3 Hu / Dom3A mu (aa 328-363)	SEQ ID NO: 22
◦ CDH3 Hu / Dom3B mu (aa 364-403)	SEQ ID NO: 23

◦ CDH3 Hu / Dom3C mu (aa 404-440)	SEQ ID NO: 24
• CDH3 Hu / Dom4 mu (aa 441-546)	SEQ ID NO: 25
◦ CDH3 Hu / Dom4A mu (aa 441-474)	SEQ ID NO: 26
◦ CDH3 Hu / Dom4B mu (aa 475-511)	SEQ ID NO: 27
◦ CDH3 Hu / Dom4C mu (aa 512-546)	SEQ ID NO: 28
• CDH3 Hu / Dom5 mu (aa 547-650)	SEQ ID NO: 29
◦ CDH3 Hu / Dom5A mu (aa 547-581)	SEQ ID NO: 30
◦ CDH3 Hu / Dom5B mu (aa 582-616)	SEQ ID NO: 31
◦ CDH3 Hu / Dom5C mu (aa 617-650)	SEQ ID NO: 32

La lista anterior muestra las posiciones de los diferentes dominios (Dom1-Dom5), así como de los respectivos sub-dominios A-C dentro de la secuencia de aminoácidos de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el sub-dominio D1A está situado en las posiciones de aminoácidos 108-143 de SEQ ID NO: 1. Lo mismo se aplica de manera similar a todos los demás dominios arriba enumerados.

Para la expresión en células CHO, la secuencia codificante de los dominios extracelulares quiméricos arriba descritos fue seguida en marco por la secuencia codificante de un enlazador Ser/Gly artificial, seguido de un dominio derivado del dominio transmembrana / intracelular de EpCAM humana (aminoácidos 266 -314 de la secuencia publicada en el número de acceso de GenBank NM_002354). Todas las construcciones quiméricas comprendían la secuencia señal N-terminal (péptido señal) y el pro-péptido.

Para la generación de células CHO que expresan CDH3 humana, de macaco cynomolgus ("cyno"), de ratón y quimérica humana/de ratón, las secuencias codificantes respectivas de CDH3 humana (SEQ ID NO: 2, véase también el número de acceso de GenBank NM_001793), CDH3 de cyno (SEQ ID NO: 6), CDH3 de ratón (SEQ ID NO: 10, véase también el número de acceso de GenBank NM_001037809) y de las 20 quimeras de CDH3 humana-de ratón (véase arriba) se clonaron en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). La secuencia codificante de CDH3 de macaco se obtuvo mediante clonación estándar utilizando una colección de ADNc de bazo de cynomolgus (BioChain) y oligonucleótidos específicos para la secuencia humana (5' GGCCCGCCGTCGCGGCAGC 3'; 5' CTCCTTCTCCAGGTTTGCTGGC 3'; 5' AACTG AGACCCCTTGAGATGC 3'; 5' TAGTCGTCCTCCCGCCACC 3'; 5' GGAGGGTGGGA CAAACACAGG 3'; 5' ACGTTGAAGTGACCAACGAGGC 3') que hibridan en la región no traducida o regiones de secuencia conservada del transcrito de ARNm de CDH3 humana (NM_001793). El análisis de la secuencia reveló la similitud de la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular central en comparación con las secuencias GenBank de CDH3 de rhesus (JU473826, JU473827). Todos los procesos de clonación se llevaron a cabo de acuerdo con protocolos estándares (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2001)). Para cada una de las construcciones se transfeció un plásmido correspondiente en células CHO deficientes en DHFR para la expresión eucariótica, tal como describe por Kaufman R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566.

La expresión de CDH3 (construcciones humanas, murinas y quiméricas) en células CHO se verificó en un ensayo FACS utilizando un anticuerpo IgG1 de ratón monoclonal anti-CDH3 humana que es de reactividad cruzada en ratones. El anticuerpo monoclonal unido se detectó con una IgG Fcy-PE anti-ratón. Como control negativo, las células se incubaron con PBS / FCS al 2 % en lugar del primer anticuerpo. Las muestras se midieron mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 3. La expresión de CDH3 humana y de cyno en células CHO (véase el Ejemplo 5) se detectó con R&D 861-P conjugado con PE.

Ejemplo 2

Agrupación de epítopos de fragmentos scFv murinos

Células transfectadas con CDH3 humana o murina, o con las moléculas quiméricas de CDH3 humana/de ratón (véase el Ejemplo 1) se tiñeron con extracto periplásmico bruto sin diluir que contenía scFv que se unía a CDH3 humana/de macaco. Las moléculas de scFv unidas se detectaron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-FLAG-M2 (1 µg/ml; 50 µl en PBS/FCS al 2 %; Sigma F1804) seguido de una IgG Fcy-PE anti-ratón (1:100, 50 µl; Jackson Immunoresearch nº 115-116-071). Todos los anticuerpos se diluyeron en PBS con FCS al 2 %. Como control negativo, las células se incubaron con PBS/FCS al 2% en lugar del extracto periplásmico. Las muestras se midieron mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Específicamente, la Figura 4A muestra construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos (aglutinantes) que reconocen el dominio extracelular D1 de CDH3 humana y, más precisamente, el sub-dominio D1B (pérdida de la señal FACS en las respectivas construcciones quiméricas de CDH3). Obsérvese que el aglutinante denominado

CDH3-6 es el aglutinante parental de CDH3-4. El aglutinante denominado CDH3-10 es el aglutinante parental de CDH3-1, CDH3-2 y CDH3-3. La Figura 4B muestra aglutinantes que reconocen el dominio extracelular D2 de CDH3 humana y, más precisamente, el sub-dominio D2C. Obsérvese que el aglutinante denominado CDH3-21 es el aglutinante parental de CDH3-11, CDH3-12 y CDH3-14. El aglutinante denominado CDH3-23 es el aglutinante parental de CDH3-13. Finalmente, la Figura 4C muestra aglutinantes que reconocen el dominio extracelular D3 de CDH3 humana y, más precisamente, el sub-dominio D3A. Obsérvese que el aglutinante denominado CDH3-32 se une, además, al sub-dominio D3C. El aglutinante denominado CDH3-32 es el aglutinante parental de CDH3-25, CDH3-26 y CDH3-27. El aglutinante denominado CDH3-33 es el aglutinante parental de CDH3-24. La expresión "aglutinante parental" significa en este contexto que estos aglutinantes se desarrollaron adicionalmente con el fin de generar u obtener aglutinantes optimizados.

Los aglutinantes CDH3-11, CDH3-12, CDH3-13 y CDH3-14 también se han sometido al análisis de agrupación de epítomos y se ha demostrado que reconocen el dominio extracelular D2 de CDH3 humana y, más precisamente, el sub-dominio D2C (datos no mostrados). El mismo análisis se llevó a cabo además con los aglutinantes CDH3-24, CDH3-25, CDH3-26 y CDH3-27. Estos aglutinantes reconocieron el dominio extracelular D3 de la CDH3 humana y, más precisamente, el sub-dominio D3A (datos no mostrados).

Ejemplo 3

Determinación basada en Biacore de la afinidad del anticuerpo por CDH3 humana y de cynomolgus

Los experimentos de análisis de Biacore se realizaron utilizando proteínas de fusión CDH3 recombinante (CDH3 humana y de cyno, respectivamente) con albúmina humana (HALB, por sus siglas en inglés) para determinar la unión a la diana de CDH3 de los anticuerpos de la invención.

En detalle, los chips sensores CM5 (GE Healthcare) se inmovilizaron con aproximadamente 600-800 UR del antígeno recombinante respectivo utilizando tampón acetato pH 4,5 de acuerdo con el manual del fabricante. Las muestras de anticuerpos biespecíficos CDH3xCD3 se cargaron en cinco concentraciones: 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM y 3,13 nM diluidas en tampón de desarrollo HBS-EP (GE Healthcare). El caudal fue de 30 µl/min durante 3 min, luego se aplicó tampón de desarrollo HBS-EP durante 8 min a 20 min de nuevo a un caudal de 30 µl/ml. La regeneración del chip se realizó utilizando una solución de glicina 10 mM, NaCl 10 mM, pH 1,5. Los conjuntos de datos se analizaron utilizando el software BiaEval. En general, se realizaron dos experimentos independientes.

Las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 de acuerdo con la invención mostraron altas afinidades por CDH3 humana en el intervalo nanomolar de 1 dígito. La unión a CDH3 de macaco fue equilibrada, mostrando también afinidades en intervalos similares. Los valores de afinidad así como el hueco de afinidad calculada se muestran en la Tabla 2. CDH3-25 × F12q-HALB and CDH3-13- x12C-HLE (Fc) se midieron cada uno en un ensayo separado y se demostró que tenían

- una KD (hu) de $31,8 \pm 1,9$ nM, una KD (cyno) de $40,9 \pm 3,89$ nM y una brecha de afinidad de 1,29, y
- una KD (hu) de $12,95 \pm 0,5$ nM, una KD (cyno) de $12,35 \pm 0,35$ nM y una brecha de afinidad de 0,95, respectivamente.

Tabla 2: Afinidades de los anticuerpos biespecíficos CDH3xCD3 contra CDH3 humana y de macaco de acuerdo con lo determinado por el análisis de Biacore, así como las brechas de afinidad entre especies calculadas.

Anticuerpo CDH3xCD3	biespecífico	KD CDH3 hu [nM]	KD CDH3 cyno [nM]	Brecha de afinidad cyno / hu
CDH3-11		7,5	6,2	0,83
CDH3-12		8,8	7,5	0,85
CDH3-13		7,4	6,0	0,81
CDH3-14		9,5	8,1	0,85
CDH3-24		6,1	5,2	0,85
CDH3-25		7,9	6,7	0,85
CDH3-26		8,8	7,5	0,85
CDH3-27		8,7	7,6	0,87

Ejemplo 4**Análisis basado en Scatchard de la afinidad de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3 por CDH3 humana y de macaco en células positivas al antígeno diana y determinación de la brecha de afinidad entre especies**

Las afinidades de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 por células CHO transfectadas con CDH3 humana o de macaco también se determinaron mediante análisis de Scatchard como el método más fiable para medir las brechas de afinidad potenciales entre CDH3 humana y de macaco. Para el análisis de Scatchard, los experimentos de unión por saturación se realizan utilizando un sistema de detección monovalente para determinar con precisión la unión monovalente de los anticuerpos biespecíficos CDH3xCD3 a la línea celular respectiva.

Se incubaron 2×10^4 células de la línea celular respectiva (línea celular CHO que expresa CDH3 de forma recombinante humana, línea celular CHO que expresa CDH3 de forma recombinante de macaco) cada una con 50 μ l de una serie de diluciones triples (doce diluciones a 1:2) del respectivo anticuerpo biespecífico CDH3xCD3 (hasta alcanzar la saturación) comenzando a 10-20 nM seguido de 16 h de incubación a 4 °C con agitación y una etapa de lavado residual. Luego, las células se incubaron durante otra hora con 30 μ l de una solución de conjugado CD3xALEXA488. Después de una etapa de lavado, las células se resuspendieron en 150 μ l de tampón FACS que contenía formaldehído al 3,5 %, se incubaron durante 15 min adicionales, se centrifugaron, se resuspendieron en tampón FACS y se analizaron utilizando una máquina FACS Cantoll y el software FACS Diva. Los datos se generaron a partir de dos conjuntos independientes de experimentos, cada uno de los cuales utilizó triplicados. Se calculó el análisis de Scatchard respectivo para extrapolar la unión máxima (B_{máx}). Las concentraciones de anticuerpos biespecíficos CDH3xCD3 a la mitad de la unión máxima se determinaron reflejando las KDs respectivas. Los valores de las mediciones por triplicado se representaron como curvas hiperbólicas y como curvas en forma de S para demostrar los intervalos de concentraciones adecuados desde la unión mínima hasta la óptima.

Los valores representados en la Tabla 3 se derivaron de dos experimentos independientes por construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CDH3xCD3. El análisis de Scatchard basado en células confirmó que los anticuerpos biespecíficos CDH3xCD3 de la invención tienen una afinidad nanomolar a sub-nanomolar por CDH3 humana y se presentan con una pequeña brecha de afinidad por CDH3 entre especies de cyno/humana de alrededor de 1. CDH3-25 \times F12q-HALB y CDH3-13 \times I2C-HLE (Fc) se midieron cada uno en un ensayo separado y se demostró que tenían

- una afinidad celular (hu) de $0,37 \pm 0,11$ nM, una afinidad celular (cyno) de $0,35 \pm 0,08$ nM y una brecha de afinidad de 0,95, y
- una afinidad celular (hu) de $0,32 \pm 0,003$ nM, una afinidad celular (cyno) de $0,5 \pm 0,09$ nM y una brecha de afinidad de 1,56, respectivamente.

Tabla 3: Afinidades (KD) de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 determinadas en análisis de Scatchard basados en células con la brecha de afinidad calculada KD de CDH3 de macaco/KD de CDH3 humana. Los anticuerpos se midieron en dos experimentos independientes, cada uno utilizando triplicados.

Anticuerpo biespecífico CDH3xCD3	Afinidad basada en células CDH-3 hu [nM]	Afinidad basada en células CDH-3 mac [nM]	Brecha de afinidad KDmac/KDhu CDH-3
CDH3-11	$1,74 \pm 0,37$	$1,98 \pm 0,67$	1,14
CDH3-12	$0,40 \pm 0,27$	$0,52 \pm 0,21$	1,30
CDH3-13	$0,42 \pm 0,35$	$0,41 \pm 0,28$	0,98
CDH3-14	$0,49 \pm 0,14$	$0,41 \pm 0,03$	0,84
CDH3-24	$0,09 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,07$	1,67
CDH3-25	$0,12 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,03$	0,96
CDH3-26	$0,17 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,04$	0,94
CDH3-27	$0,20 \pm 0,10$	$0,23 \pm 0,03$	1,15

Ejemplo 5**Unión biespecífica y reactividad cruzada entre especies**

Para confirmar la unión a CDH3 y CD3 humanas y a CDH3 y CD3 de cyno, se analizaron construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos mediante citometría de flujo utilizando

- células CHO transfectadas con CDH3 humana y de cyno, respectivamente,
- la línea celular A431 de carcinoma epidermoide positivo para CDH3 humana,
- línea celular HPB-all de leucemia de células T humanas que expresan CD3 (DSMZ, Braunschweig, ACC483), y
- la línea de células T que expresan CD3 de cynomolgus HSC-F.

Además, se utilizaron células CHO transfectadas con CDH3 murino como control negativo.

Para la citometría de flujo, se incubaron 200.000 células de las líneas celulares respectivas durante 30 min en hielo con 50 µl de anticuerpo biespecífico purificado a una concentración de 5 µg/ml. Las células se lavaron dos veces en PBS/FCS al 2 % y la unión de las construcciones se detectó con un anticuerpo de ratón interno específico para la parte de unión a CD3. Después del lavado, los anticuerpos de ratón unidos se detectaron con Fcy-PE de cabra anti-ratón. Las muestras se midieron por citometría de flujo.

Los resultados se muestran en las Figuras 5A y 5B. Las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 de la invención tiñeron células CHO transfectadas con CDH3 humana y con CDH3 de cyno, y también tiñeron la línea celular A431 de carcinoma epidermoide positivo para CDH3 humana (expresador natural), así como células T cyno y humanas que expresan CD3. Además, no hubo tinción de las células de control negativo (CHO transfectadas con CDH3 murina).

Ejemplo 6

Confirmación de la ausencia de unión a parálogos humanos y de macacos

Los parálogos de CDH3 humana y de macaco (CDH1 = E-cadherina, CDH2 = N-cadherina, CDH4 = R-cadherina y CDH5 = VE-cadherina) se transfectaron de forma estable en células CHO dhfr^{-/-}. La expresión de proteínas se confirmó en análisis FACS con anticuerpos específicos para los parálogos respectivos. Los anticuerpos fueron R&D MAB18381 (para CDH1), eBioscience 12-3259-41 (para CDH2), R&D Systems polyclonal AF2217 (para CDH4) y BD Bioscience n° 555661 (para CDH5).

Las secuencias de los parálogos como se utilizan en el presente Ejemplo se identifican en el listado de secuencias (SEQ ID NOs: 41-44). También se pueden encontrar en los siguientes números de acceso de GenBank:

NM_004360 [CDH1 humana]

NM_001792 [CDH2 humana]

NM_001794 [CDH4 humana]

NM_001795 [CDH5 humana]

El ensayo de citometría de flujo se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 5. Los resultados se muestran en las Figuras 5C y 5D. El análisis confirmó que ninguna de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de CDH3xCD3 de la invención reacciona de forma cruzada con cualquiera de los parálogos de CDH3 humana testados.

También se verificó que los anticuerpos de la invención no reaccionaban de forma cruzada con los parálogos CDH1, CDH2, CDH4 y CDH5 de CDH3 de macaco (datos no mostrados). La expresión de parálogos de macaco en células CHO se verificó con los mismos anticuerpos que los arriba descritos para los parálogos humanos. Las secuencias de los parálogos de macaco tal como se utilizan en el presente Ejemplo se identifican en el listado de secuencias (SEQ ID NOs 45-48). También se pueden encontrar en los siguientes números de acceso de GenBank:

XM_002802516 [CDH1 de macaco]

JU321883 [CDH2 de macaco]

XM_002802511 [CDH5 de macaco]

Además, la secuencia de CDH4 de macaco se obtuvo de Ensembl Genome Browser (ENSMUT00000017252) y se condensó en el extremo N en marco con el péptido señal CDH4 humana (aminoácidos 1-19).

Ejemplo 7:**Identidad con la línea germinal humana**

Con el fin de analizar la identidad / similitud de la secuencia de las construcciones de anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla con los genes de la línea germinal del anticuerpo humano, los aglutinantes CDH3 de la invención se alinearon de la siguiente manera: se alineó la VL completa, incluyendo todas las CDRs; se alineó la VH completa, incluyendo las CDRs 1 y 2, pero excepto que la CDR3 se alineó contra los genes de la línea germinal de anticuerpos humanos (Vbase). Se pueden encontrar más detalles en la memoria descriptiva de esta solicitud. Los resultados se muestran en la Tabla 4 que figura a continuación:

Tabla 4: Identidad de VH y VL con la línea germinal humana

Anticuerpo biespecífico CDH3xCD3	Identidad de VH y VL con la línea germinal humana
CDH3-11	92,7
CDH3-12	93,6
CDH3-13	87,8
CDH3-14	94,1
CDH3-24	89,4
CDH3-25	89,8
CDH3-26	89,8
CDH3-27	90,7

Ejemplo 8**Actividad citotóxica**

La potencia de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 de la invención para redirigir las células T efectoras contra las células diana que expresan CDH3 se analizó en cinco ensayos de citotoxicidad *in vitro*:

- Se midió la potencia de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 para redirigir células T efectoras CD8⁺ humanas estimuladas contra células CHO transfectadas con CDH3 humana en un ensayo de liberación de 51-cromo de 18 horas. Resultados, véase la Figura 6.
- La potencia de las construcciones de anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla CDH3xCD3 para redirigir las células T efectoras CD8⁺ humanas estimuladas contra la línea celular de carcinoma humano CDH3-positiva A431 se midió en un ensayo de liberación de 51-cromo de 18 horas. Resultados, véase la Figura 7.
- La potencia de las construcciones de anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla CDH3xCD3 para redirigir las células T en PBMC humanas no estimuladas contra células CHO transfectadas con CDH3 humana se midió en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas. Resultados, véase la Figura 8.
- La potencia de las construcciones de anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla CDH3xCD3 para redirigir las células T en PBMC humanas no estimuladas contra la línea celular de carcinoma humano CDH3-positiva A431 se midió en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas. Resultados, véase la Figura 9.
- Para confirmar que las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 con reactividad cruzada son capaces de redirigir las células T de macaco contra las células CHO transfectadas con CDH3 de macaco, se realizó un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas con una línea de células T de macaco como células T efectoras. Resultados, véase la Figura 10.

Ejemplo 8.1**Ensayo de liberación de cromo con células T humanas estimuladas**

Se obtuvieron células T estimuladas enriquecidas con células T CD8⁺ como se describe en lo que sigue. Se revistió una placa de Petri (145 mm de diámetro, Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster) con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (OKT3, Orthoclone) en una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37°C. La

proteína no unida se eliminó mediante una etapa de lavado con PBS. 3 - 5 × 10⁷ PBMC humanas se añadieron a la placa de Petri precubierta en 120 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / FCS al 10 % / IL-2 20 U/ml (Proleukin®, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 hasta una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron de nuevo durante un día en el mismo medio de cultivo celular que antes. Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) se enriquecieron mediante el agotamiento de las células T CD4⁺ y las células NK CD56⁺ utilizando Dynal-Beads de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Células diana CHO transfectadas con CDH3 de Cyno o CDH3 humana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ⁵¹Cr en un volumen final de 100 µl de RPMI con FCS al 50 % durante 60 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y luego se utilizaron en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 200 µl de RPMI complementado con una relación E:T de 10:1. Se utilizó una concentración inicial de 0,01 - 1 µg/ml de anticuerpo biespecífico purificado y diluciones triples del mismo. El tiempo de incubación del ensayo fue de 18 horas. La citotoxicidad se determinó como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante con relación a la diferencia de lisis máxima (adición de Triton-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se realizaron por cuadruplicado. La medición de la actividad de cromo en los sobrenadantes se realizó en un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los resultados se llevó a cabo con Prism 5 para Windows (versión 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EE.UU.) Los valores de CE50 calculados por el programa de análisis a partir de las curvas de respuesta a la dosis sigmoidea se utilizaron para comparar la actividad citotóxica.

Ejemplo 8.2

Potencia de redirigir células T efectoras humanas estimuladas contra células CHO transfectadas con CDH3 humana

La actividad citotóxica de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 de acuerdo con la invención se analizó en un ensayo de citotoxicidad de liberación de 51-cromo (⁵¹Cr) utilizando células CHO transfectadas con CDH3 humana como células diana y células T CD8⁺ humanas estimuladas como células efectoras. El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 8.1.

Los resultados se muestran en la Figura 6 y la Tabla 5. Las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 mostraron una potente actividad citotóxica contra células CHO transfectadas con CDH3 humana, incluso hasta el intervalo picomolar de 1 dígito. Las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla reivindicadas - que son específicas para la agrupación de epítopos correspondientes a las posiciones 291-363 de la CDH3 humana - se presentan con una relación favorable de epítipo-actividad que respalda la potente actividad citotóxica mediada por anticuerpos biespecíficos. CDH3-25 × F12q-HALB y CDH3-13 xI2C-HLE (Fc) se midieron en cada caso en un ensayo separado y se demostró que tenían una CE50 de 3,6 pM y 8,9 pM, respectivamente.

Tabla 5: Valores de CE50 [pg/ml] de construcciones de anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla CDH3xCD3 analizados en un ensayo de citotoxicidad de liberación de 51-cromo (⁵¹Cr) utilizando células CHO transfectadas con CDH3 humana como células diana y células T CD8 humanas estimuladas como células efectoras.

Anticuerpo biespecífico CDH3xCD3	CE50 [pg/ml]
CDH3-11	76
CDH3-12	370
CDH3-13	7,2
CDH3-14	138
CDH3-24	14
CDH3-25	4,9
CDH3-26	21
CDH3-27	61

Ejemplo 8.3

Potencia de redirigir células T efectoras humanas estimuladas contra la línea A431 de carcinoma humano CDH3-positiva

La actividad citotóxica de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 se analizó en un ensayo de citotoxicidad de liberación de 51-cromo (^{51}Cr) utilizando la línea celular A431 de carcinoma epidermoide humano CDH3-positivo como fuente de células diana y células T CD8+ humanas estimuladas como células efectoras. El ensayo se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 8.1.

De acuerdo con los resultados de los ensayos de liberación de 51-cromo con linfocitos T CD8+ humanos enriquecidos estimulados como células efectoras y células CHO transfectadas con CDH3 humana como células diana, las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 de la presente invención también son potentes en actividad citotóxica contra células diana de expresión natural (Figura 7 y Tabla 6). CDH3-25 x F12q-HALB y CDH3-13 x I2C-HLE (Fc) se midieron en cada caso en un ensayo separado y se demostró que tenían una CE50 de 1,2 pM y 16 pM, respectivamente.

Tabla 6: Valores de CE50 [pg/ml] de construcciones de anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla CDH3xCD3 analizados en un ensayo de citotoxicidad de liberación de cromo 51 (^{51}Cr) de 18 horas con la línea celular A431 de carcinoma humano CDH3-positivo como fuente de células diana, y células T CD8 humanas enriquecidas estimuladas como células efectoras.

Anticuerpo biespecífico CDH3xCD3	CE50 [pg/ml]
CDH3-11	47
CDH3-12	362
CDH3-13	62
CDH3-14	385
CDH3-24	5,8
CDH3-25	4,6
CDH3-26	19
CDH3-27	31

Ejemplo 8.4

Ensayo de citotoxicidad basado en FACS con PBMC humanas no estimuladas

Aislamiento de células efectoras

Se prepararon células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) humana mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll a partir de preparaciones de linfocitos enriquecidos (capas leucocitarias), un producto secundario de los bancos de sangre que recogen sangre para transfusiones. Las capas leucocitarias fueron suministradas por un banco de sangre local y las PBMC se prepararon el mismo día de la extracción de sangre. Después de la centrifugación de densidad Ficoll y extensos lavados con PBS de Dulbecco (Gibco), los eritrocitos restantes se eliminaron de las PBMC por medio de incubación con tampón de lisis de eritrocitos (NH_4Cl 155 μM , KHCO_3 10 mM, EDTA 100 mM). Las plaquetas se eliminaron a través del sobrenadante tras la centrifugación de PBMC a $100 \times g$. Los linfocitos restantes comprenden principalmente linfocitos B y T, células NK y monocitos. PBMC se mantuvieron en cultivo a $37^\circ\text{C}/5\%$ de CO_2 en medio RPMI (Gibco) con FCS al 10% (Gibco).

Agotamiento de células CD14+ y CD56+

Para el agotamiento de células CD14+, se utilizaron microperlas CD14 humanas (Milteny Biotec, MACS, nº 130-050-201), para el agotamiento de microperlas CD56 humanas de células NK (MACS, nº 130-050-401). Se contaron las PBMC y se centrifugaron durante 10 min a temperatura ambiente con $300 \times g$. El sobrenadante se desechó y el sedimento celular se resuspendió en tampón de aislamiento MACS [80 $\mu\text{L}/10^7$ células; PBS (Invitrogen, nº 20012-043), FBS al 0,5 % (v/v) (Gibco, nº 10270-106), EDTA 2 mM (Sigma-Aldrich, nº E-6511)]. Se añadieron microperlas CD14 y microperlas CD56 (20 $\mu\text{L}/10^7$ células) y se incubaron durante 15 min a $4 - 8^\circ\text{C}$. Las células se lavaron con tampón de aislamiento MACS (1-2 mL/ 10^7 células). Después de la centrifugación (véase arriba), el sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en tampón de aislamiento MACS (500 $\mu\text{L}/10^8$ células). A continuación, se aislaron células negativas para CD14/CD56 utilizando Columnas LS (Milteny Biotec, nº 130-042-401). Se cultivaron células PBMC sin CD14+/CD56+ en medio completo RPMI, es decir, RPMI1640 (Biochrom AG, nº FG1215) complementado con FBS al 10% (Biochrom AG, nº S0115), 1x aminoácidos no esenciales (Biochrom AG, nº K0293), tampón Hepes 10 mM (Biochrom AG, nº L1613), piruvato de sodio 1 mM (Biochrom AG, nº L0473) y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Biochrom AG, nº A2213) a 37°C en una incubadora hasta que se necesite.

Marcaje de células diana

Para el análisis de la lisis celular en los ensayos de citometría de flujo, se utilizó el colorante de membrana fluorescente DiOC₁₈ (DiO) (Molecular Probes, nº V22886) para marcar las células CHO transfectadas con CDH3 humana o CDH3 de macaco como células diana y distinguirlas de las células efectoras. Brevemente, se recogieron las células, se lavaron una vez con PBS y se ajustó a 10⁶ células/mL en PBS que contiene FBS al 2% (v/v) y el colorante de membrana DiO (5 µL/10⁶ células). Después de incubación durante 3 min a 37 °C, las células se lavaron dos veces en medio RPMI completo y el número de células se ajustó a 1,25 × 10⁵ células/mL. La vitalidad de las células se determinó utilizando una solución de EosinaG isotónica al 0,5% (v/v) (Roth, nº 45380).

Análisis basado en citometría de flujo

Este ensayo se diseñó para cuantificar la lisis de células CHO transfectadas con CDH3 humana o de cyno en presencia de diluciones en serie de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de CDH3. Se mezclaron volúmenes iguales de células diana marcadas con DiO y células efectoras (es decir, PBMC sin células CD14⁺), dando como resultado una relación de células E:T de 10:1. Se transfirieron 160 µL de esta suspensión a cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos. Se añadieron 40 µL de diluciones en serie de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 y un control negativo biespecífico (un anticuerpo biespecífico basado en CD3 que reconoce un antígeno diana irrelevante) o medio completo RPMI como control negativo adicional. La reacción citotóxica mediada por anticuerpos biespecíficos prosiguió durante 48 horas en una incubadora humidificada con 7% de CO₂. Luego, las células se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos y se vigiló la pérdida de integridad de la membrana de la célula diana añadiendo yoduro de propidio (PI) a una concentración final de 1 µg/mL. El PI es un colorante impermeable a la membrana que normalmente se excluye de las células viables, mientras que las células muertas lo absorben y se vuelven identificables por emisión fluorescente.

Las muestras se midieron mediante citometría de flujo en un instrumento FACSCanto II y se analizaron con el software FACSDiva (ambos de Becton Dickinson). Las células diana se identificaron como células positivas para DiO. Las células diana PI negativas se clasificaron como células diana vivas. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Cytotoxicity [\%]} = \frac{n_{\text{dead target cells}}}{n_{\text{target cells}}} \times 100$$

n = número de eventos

Utilizando el software GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego), se representó gráficamente el porcentaje de citotoxicidad frente a las concentraciones de anticuerpos biespecíficos correspondientes. Las curvas de respuesta a la dosis se analizaron con los cuatro modelos de regresión logística paramétrica para la evaluación de las curvas de respuesta a la dosis sigmoidea con pendiente de colina fija y se calcularon los valores de CE50.

Ejemplo 8.5

Potencia de redirigir PBMC humanas no estimuladas contra células CHO transfectadas con CDH3 humana

La actividad citotóxica de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 se analizó en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS utilizando células CHO transfectadas con CDH3 humana como células diana y PBMC humanas no estimuladas como células efectoras. El ensayo se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 8.4 anterior.

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad basados en FACS con PBMC humanas no estimuladas como células efectoras y células CHO transfectadas con CDH3 humana como dianas se muestran en la Figura 8 y la Tabla 7. CDH3-25 × F12q-HALB y CDH3-13 xI2C-HLE (Fc) se midieron en cada caso en un ensayo separado y se demostró que tenían una CE50 de 4,6 pM y 5,6 pM, respectivamente.

Tabla 7: Valores de CE50 [pg/ml] de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 medidos en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas con PBMC humanas no estimuladas como células efectoras y células CHO transfectadas con CDH3 humano como células diana.

Anticuerpo biespecífico CDH3xCD3	CE50 [pg/ml]
CDH3-11	462
CDH3-12	1021
CDH3-13	129
CDH3-14	1885
CDH3-24	19

Anticuerpo biespecífico CDH3xCD3	CE50 [pg/ml]
CDH3-25	10
CDH3-26	47
CDH3-27	61

Ejemplo 8.6

5 Potencia de redirigir PBMC humanas no estimuladas contra la línea A431 de carcinoma humano CDH3-positivo

La actividad citotóxica de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 se analizó, además, en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS utilizando la línea celular A431 de carcinoma epidermoide humano CDH3-positivo como fuente de células diana y PBMC humanas no estimuladas como células efectoras. El ensayo se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 8.4 anterior. Los resultados se muestran en la Figura 9 y la Tabla 8. CDH3-25 x F12q-HALB y CDH3-13 xI2C-HLE (Fc) se midieron en cada caso en un ensayo separado y se demostró que tenían una CE50 de 2,3 pM y 32 pM, respectivamente.

Tabla 8: Valores de CE50 [pg/ml] de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 medidos en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas con PBMC humanas no estimuladas como células efectoras y la línea celular A431 como fuente de células diana.

Anticuerpo biespecífico CDH3xCD3	CE50 [pg/ml]
CDH3-11	389
CDH3-12	3141
CDH3-13	83
CDH3-14	4842
CDH3-24	15
CDH3-25	9,2
CDH3-26	35
CDH3-27	41

Como era de esperar, los valores de CE50 fueron generalmente más altos en los ensayos de citotoxicidad con PBMC no estimuladas como células efectoras en comparación con los ensayos de citotoxicidad que utilizaron células T CD8+ humanas estimuladas.

Ejemplo 8.7

25 Potencia de redirigir células T de macaco contra células CHO transfectadas con CDH3 de macaco

Finalmente, se analizó la actividad citotóxica de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 se analizó en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS utilizando células CHO transfectadas con CDH3 de macaco (cyno) como células diana y una línea de células T de macaco como fuente de células efectoras. La línea de células T de macaco 4119LnPx (Knappe et al. Blood 95:3256-61 (2000)) se utilizó como fuente de células efectoras. El marcaje de células diana de células CHO transfectadas con CDH3 de macaco y el análisis basado en citometría de flujo de la actividad citotóxica se realizó como se describe arriba.

Resultados se muestran en la Figura 10 y la Tabla 9. Células T de macaco procedentes de la línea celular 4119LnPx se indujeron para matar de manera eficaz células CHO transfectadas con CDH3 de macaco mediante construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 de la invención, *es decir*, construcciones de anticuerpos de cadena sencilla que se unen a una agrupación de epítomos de CDH3 humana correspondiente a las posiciones 291-363 de CDH3 humana y que abarca los sub-dominios vecinos D2C (posiciones 291-327) y D3A (posiciones 328-363). Las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla presentaron en este ensayo potentes valores de CE50 de pg/ml de 2 dígitos a muy bajos de 4 dígitos, lo que confirma que estas construcciones de anticuerpos de cadena sencilla son muy activas en el sistema del macaco.

Se ha identificado otro grupo de anticuerpos biespecíficos anti-CDH3 durante la agrupación de epítomos (véase el Ejemplo 2), que se unen al dominio extracelular D1 y, más específicamente, al sub-dominio D1B de CDH3 humana. Inesperadamente, los anticuerpos biespecíficos CDH3xCD3 de este grupo - aunque potentes en la actividad citotóxica

contra células CHO transfectadas con CDH3 humana - demostraron exhibir una actividad citotóxica muy débil contra las células CHO transfectadas con CDH3 de macaco (véase la Figura 10C y la Tabla 9). Los anticuerpos biespecíficos de este grupo mostraron una potencia significativamente más débil con valores de CE50 en el intervalo muy alto de 4 dígitos e incluso en el intervalo de pg/ml de 5 dígitos. CDH3-25 x F12q-HALB y CDH3-13 x I2C-HLE (Fc) se midieron en cada caso en un ensayo separado y se demostró que tenían una CE50 de 1,4 pM y 4,0 pM, respectivamente.

Las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 de la invención que se unen a una agrupación de epítomos de CDH3 correspondientes a las posiciones 291-363 son, por lo tanto, de 5 a casi 1000 veces más potentes en el sistema de macacos que los anticuerpos que se unen al dominio extracelular D1, y más concretamente, al sub-dominio D1B de CDH3.

Tabla 9: valores de CE50 [pg/ml] de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 que se unen a una agrupación de epítomos de CDH3 correspondientes a las posiciones 291-363 (filas 1-8) y de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 que se unen a una agrupación de epítomos de CDH3 / sub-dominio D1B (filas 9 a 12) según se mide en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas con la línea de células T de macaco 4119LnPx como células efectoras y células CHO transfectadas con CDH3 de macaco como células diana.

	anticuerpo biespecífico CDH3xCD3	CE50 [pg/ml]
--	----------------------------------	--------------

1	CDH3-11	1183
2	CDH3-12	1325
3	CDH3-13	257
4	CDH3-14	1015
5	CDH3-24	32
6	CDH3-25	14
7	CDH3-26	37
8	CDH3-27	98
9	CDH3-1	13055
10	CDH3-2	12862
11	CDH3-3	8390
12	CDH3-4	8795

Ejemplo 9

Conversión de monómero a dímero después de (i) tres ciclos de congelación/descongelación y (ii) 7 días de incubación a 250 µg/ml

El monómero de anticuerpo CDH3xCD3 biespecífico se sometió a diferentes condiciones de estrés seguidas de SEC de alto rendimiento para determinar el porcentaje de anticuerpo inicialmente monomérico, que se había convertido en dímero de anticuerpo.

(i) Se ajustaron 15 µg de anticuerpo monomérico a una concentración de 250 µg/ml con tampón de formulación genérica y luego se congelaron a -80 °C durante 30 min, seguido de descongelación durante 30 min a temperatura ambiente. Después de tres ciclos de congelación/descongelación, se determinó el contenido de dímero mediante HP-SEC.

(ii) Se ajustaron 15 µg de anticuerpo monomérico a una concentración de 250 µg/ml con tampón de formulación genérica, seguido de incubación a 37 °C durante 7 días. El contenido de dímero se determinó mediante HP-SEC.

Se conectó una columna SEC TSK Gel G3000 SWXL de alta resolución (Tosoh, Tokio-Japón) a un Purificador Äkta 10 FPLC (GE Lifesciences) equipado con un muestreador automático A905. El equilibrio de la columna y el tampón de desarrollo consistieron en KH₂PO₄ 100 mM - Na₂SO₄ 200 mM ajustado a pH 6,6. Se aplicó la solución de anticuerpo (15 µg de proteína) a la columna equilibrada y se llevó a cabo la elución a un caudal de 0,75 ml/min a una presión máxima de 7 Mpa. Todo el ciclo se vigiló a una absorbancia óptica de 280, 254 y 210 nm. El análisis se realizó mediante la integración de picos de la señal de 210 nm registrada en la hoja de evaluación de ejecución del software Äkta Unicorn. El contenido de dímero se calculó dividiendo el área del pico de dímero por el área total del pico de monómero más pico de dímero.

Los resultados se muestran en la Tabla 10 que figura más adelante. Las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 que se unen a la agrupación de epítomos / sub-dominio extracelular D2C presentaron porcentajes de dímeros de ≤ 1 % y, más precisamente, porcentajes de dímeros de 0,0 % después de tres ciclos de congelación/descongelación, así como después de 7 días de incubación en 37 °C, lo que se considera muy bueno. Las tasas de conversión de dímeros de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 de la agrupación de epítomos / sub-dominio extracelular D3A alcanzaron valores de ≤ 2 %, y más precisamente entre 0,2 y 1,8, lo que se considera bueno. CDH3-25 x F12q-HALB y CDH3-13 x I2C-HLE (Fc) se midieron cada uno en un ensayo separado y se demostró que tenían un porcentaje de dímero después de tres ciclos de congelación/descongelación de 1,1 y 0,84, respectivamente, y un porcentaje de dímero después de 7 días de incubación de 0,0 (ambas construcciones HLE).

Tabla 10: Porcentaje de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 monoméricos frente a dímeros según se determina por cromatografía de exclusión por tamaños de alta resolución (HP-SEC).

Anticuerpo CDH3xCD3	Porcentaje de dímero después de tres ciclos de congelación/descongelación	Porcentaje de dímero tras 7 días de incubación
CDH3-11	0,00	0,00
CDH3-12	0,00	0,00
CDH3-13	0,00	0,00
CDH3-14	0,00	0,00
CDH3-24	1,01	0,20
CDH3-25	1,31	0,60
CDH3-26	0,82	1,80
CDH3-27	1,69	1,50

Ejemplo 10

Termoestabilidad

La temperatura de agregación de anticuerpos se determinó como sigue: 40 µl de solución de anticuerpo a 250 µg/ml se transfirieron a una cubeta de un solo uso y se colocaron en un dispositivo Wyatt Dynamic Light Scattering DynaPro Nanostar (Wyatt). La muestra se calentó de 40 °C a 70 °C a una tasa de calentamiento de 0,5 °C/min con adquisición constante del radio medido. El paquete de software suministrado con el dispositivo DLS utilizó el incremento del radio que indica la fusión de la proteína y la agregación para calcular la temperatura de agregación del anticuerpo.

Todas las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos CDH3xCD3 de la invención mostraron una estabilidad térmica muy favorable con temperaturas de agregación por encima de 54 °C, como se muestra en la Tabla 11 que figura más adelante. CDH3-25 x F12q-HALB se midió en un ensayo separado y se demostró que tenía una termoestabilidad de 56,3 °C.

Tabla 11: Termoestabilidad de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos según se determina por DLS (dispersión de luz dinámica)

Anticuerpo biespecífico CDH3xCD3	Termoestabilidad (agregación DLS °C)
CDH3-11	59,8
CDH3-12	55,9
CDH3-13	59,6
CDH3-14	59,6
CDH3-24	55,1
CDH3-25	55,4
CDH3-26	54,9
CDH3-27	54,1

Ejemplo 11

Estabilidad después de la incubación durante 24 horas en plasma humano

Construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos purificados se incubaron en una relación de 1:5 en una mezcla de plasma humano a 37 °C durante 24 h-96 h a una concentración final de 2-20 µg/ml. Después de la incubación con plasma, las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla se compararon en un ensayo de liberación de 51-cromo con células T humanas estimuladas y células CHO transfectadas con CDH3 a una concentración inicial de 0,01-0,1 µg/ml y con una relación de efector a célula diana (E:T) de 10:1 (ensayo como se describe en el Ejemplo 8.1 Ensayo de liberación de cromo con células T humanas estimuladas). Construcciones de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos no incubadas, recién descongeladas se incluyeron como controles. Los resultados se muestran en la Tabla 12. Todas las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla analizadas tenían una estabilidad plasmática favorable (CE_{50} plasma / CE_{50} control) de ≤ 4 , el grupo de construcciones de anticuerpos de cadena sencilla que se unían a D3A tenía incluso una estabilidad plasmática de ≤ 3 . CDH3-25 x F12q-HALB y CDH3-13 x I2C-HLE (Fc) se midieron cada uno en un ensayo separado y se demostró que tenían

- una CE_{50} con plasma de 4,4 pM, una CE_{50} sin plasma de 3,6 pM y una relación de plasma a control de 1,2, y
- una CE_{50} con plasma de 3,4 pM, una CE_{50} sin plasma de 8,9 pM y una relación de plasma a control de 0,4, respectivamente.

Tabla 12: Valores de CE_{50} de las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla con y sin incubación con plasma y valor calculado de plasma / control

Anticuerpo biespecífico CDH3xCD3	CE_{50} [pg/mL]		Relación plasma a control (CE_{50} plasma/ CE_{50} control)
	Con plasma	Sin plasma	
CDH3-11	47	76	0,6
CDH3-12	296	370	0,8
CDH3-13	25	7,2	3,5
CDH3-14	291	138	2,1
CDH3-24	19	14	1,4
CDH3-25	9,9	4,9	2,0
CDH3-26	24	21	1,1
CDH3-27	129	61	2,1

Ejemplo 12**Turbidez a una concentración de anticuerpo de 2500 µg/ml**

1 ml de solución de anticuerpo monomérico purificado de 250 µg/ml se concentró mediante unidades de concentración de giro a 2500 µg/ml. Después de 16 h de almacenamiento a 5°C, se determinó la turbidez de la solución de anticuerpo mediante medición de la absorción óptica a DO340 nm frente al tampón de formulación genérico. Los resultados se muestran en la Tabla 13 que figura más adelante. Todas las construcciones de anticuerpos de cadena sencilla analizadas tienen una turbidez muy favorable de $\leq 0,05$. CDH3-25 × F12q-HALB y CDH3-13 × I2C-HLE (Fc) se midieron en cada caso en un ensayo separado y se demostró que tenían una turbidez a 2500 µg/ml de 0,066 y 0,026, respectivamente.

Tabla 13: Turbidez del anticuerpo después de la concentración a 2,5 mg/ml durante la noche

Anticuerpo biespecífico CDH3xCD3	Turbidez a 2500 µg/ml
CDH3-11	0,035
CDH3-12	0,025
CDH3-13	0,030
CDH3-14	0,025
CDH3-24	0,019
CDH3-25	0,026
CDH3-26	0,028
CDH3-27	0,022

Ejemplo 14**Eficacia terapéutica de un anticuerpo biespecífico CDH3xCD3 en un modelo de xenoinjerto tumoral humano**

El día 1 del estudio, las células de la línea celular de carcinoma epidermoide humano A-431 y PBMC humanas recién aisladas se co-inyectaron por vía subcutánea en el flanco dorsal derecho de ratones hembra NOD/SCID (relación de células E:T 1:2). Los ratones del grupo 1 de control con vehículo (n = 5) no recibieron células efectoras y se utilizaron como control no trasplantado para compararlos con el grupo 2 de control con vehículo (n = 10, que recibieron células efectoras) para vigilar el impacto de las PBMC en el crecimiento del tumor en ausencia de anticuerpo.

Los ratones fueron tratados con 0,5 mg/kg/día (grupo 3, n = 10), 0,05 mg/kg/día (grupo 4, n = 10) o 0,005 mg/kg/día (grupo 5, n = 10) de un anticuerpo biespecífico CDH3xCD3 que se une específicamente al sub-dominio D2C de CDH3 extracelular mediante una inyección intravenosa en bolo diaria durante 10 días consecutivos, comenzando aproximadamente 2 horas después de la inyección de células tumorales el día 1.

Los tumores se midieron con un calibre durante el estudio y se evaluó el progreso mediante la comparación entre grupos de los volúmenes de los tumores (TV). La inhibición del crecimiento del tumor T/C [%] se determinó calculando TV como T/C % = $100 \times (\text{TV mediana del grupo analizado}) / (\text{TV mediana del grupo de control 2})$.

Los resultados se muestran en la Figura 11. El tratamiento de los ratones con el anticuerpo biespecífico CDH3xCD3 a un nivel de dosis de 0,5 mg/kg/día dio como resultado una inhibición completa de la formación de tumores, y ninguno de los animales desarrolló un tumor hasta el final del estudio (día 40).

Ejemplo 15**Actividad antitumoral de un anticuerpo HLE biespecífico CDH3xCD3 en un modelo de tumor HCT-116**

El ensayo se llevó a cabo en ratones NOD/SCID hembras a los que se inyectaron por vía subcutánea células de carcinoma de colon humano HCT-116. Las células efectoras se expandieron *in vitro* y se activaron células T CD3⁺ humanas (día 12). El tratamiento se inició cuando los tumores habían alcanzado un volumen de $\sim 200 \text{ mm}^3$ (día 17). El grupo de control era un grupo tratado con vehículo q5d con células T. El anticuerpo que tiene SEQ ID NO: 425 se administró a concentraciones de 5 mg/kg/admin (grupo 2) y 0,5 mg/kg/admin (grupo 3) cada cinco días (q5d) mediante inyecciones intravenosas en bolo. Los resultados se muestran en las Figuras 12A y 12B. En particular, la Figura 12B diferencia el resultado en términos de animales que responden (7/10) y animales que no responden (3/10). Si bien la razón de la falta de respuesta en el 30 % de los animales no está clara, la Figura 12B muestra que la administración

de la construcción biespecífica de semivida prolongada en una concentración de 5 mg/kg a los animales que respondieron conduce a una interrupción del crecimiento del tumor a partir del momento de la administración del anticuerpo.

5 Ejemplo 16

Ensayo de activación de células T

10 Se cultivaron PBMC aisladas de donantes humanos sanos con concentraciones crecientes de construcciones de anticuerpos biespecíficos CDH3-13xI2C o CDH3-13xI2C-HALB durante 48 h (diluciones en serie de 0,001 pM-20 μ M). La expresión del marcador de activación CD69 en células T CD4+ y CD8+ se determinó mediante inmunotinción y citometría de flujo y conjugados mAb específicos para el antígeno. Los resultados se muestran en las Figuras 13 y se comentan arriba en esta memoria.

15 Ejemplo 17

Estudio farmacocinético de cyno de construcciones de semivida prolongada

20 Monos cynomolgus hembras recibieron una infusión i.v. durante 60 minutos con 0,015 mg/kg de una construcción de anticuerpo biespecífico de semivida prolongada (volumen de administración 1 ml/kg) en tampón. Los tres formatos HLE testados fueron P156, HALB y HALB variante 1 (véanse SEQ ID NOs: 437, 443 y 444), cada uno condensado al extremo C de la construcción. La semivida calculada de estas construcciones HLE en el modelo cyno fue de 57 horas, 63-85 horas y 68 horas, respectivamente. Estas propiedades PK sugieren una dosificación i.v. una vez a la semana en seres humanos.

25

SECUENCIAS BAYER II

SEQ ID NO	Epitopo	Designación	Formato / Fuente	Tipo	Secuencia
1		CDH3 humana	humano	aa	<p>MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEVTLAAGAEQEPGQALGKVFM</p> <p>GCPGQEPALFSTDNDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVAPI</p> <p>SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKP</p> <p>LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTRGVSVLEGVLP</p> <p>GTSMVMQVTADEDDAIYTYNGVVAYSIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVSSGLDR</p> <p>EKVPEYTLTIQATMDMGDGGSTTTAVAVVEILDANDNAPMFDPPQKYEAHVPENAVGH</p> <p>EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLMGGDDGDGDFHTTTHPESNQGLTTRKGLDFAK</p> <p>NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVVEDVNEAPVFPVPPSKVVEVQEGIPTGEPV</p> <p>CVYTAEDPPDENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGQVTA VGTLDREDEQFVRNNIYE</p> <p>VMVLAMDNGSPPTTGTGTLTLLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVLNITDKDLS</p> <p>PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVVLSLKKFLKQDITYDVHLSLDHGNKEQL</p> <p>TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGFILPVLGAVLALLFLLVLLLVRRKKRRIKEPLL</p>

[illegible]

CTGAGTACACACTGACCATCCAGGCCACAGACATGGATGGGACGCTCCACCA CCACGGCAGTGGCAGTAGTGGAGATCCTTGATGCCAATGACAATGCTCCCATGTT TGACCCCCAGAAAGTACGAGGCCCATGTGCTGAGAAATGCAGTGGGCCATGAGGT GCAGAGGCTGACGGTCACTGATCTGGACGCCCCCAACTCACAGCTGGCGTGCC ACCTACCTTATCATGGCGGTGACGACGGGACCATTITACCATCACCAACCCACC CTGAGAGCAACGAGGGCATCTTGACAACGAGGAAGGTTTGGATTTTGGAGCCA AAAACCAAGCACACCTGTACGTTGAAGTGACCAACGAGGCCCTTTTGTGCTGAA GCTCCCAACCTCCACAGCCACCATAGTGTCCACCTGGAGGATGTGAATGAGGC ACCTGTGTTGTCCACCTCCAAAGTCTTGAGGTCCAGGAGGGCATCCCCACT GGGAGCCTGTGTGTCTACACTGCAGAAAGACCCCTGACAAGAGAAATCAAAAG ATCAGCTACCCGATCCTGAGAGACCCAGCAGGTGGCTAGCCATGGACCCAGAC AGTGGCAGGTACAGCTGTGGGCACCTCGACCCGTGAGGATGAGCAGTTTGTG AGGAACAACATCTATGAAGTCAATGGTCTTGGCCATGGACAATGGAAGCCCTCCCA CCACTGGCACGGGAACCTTCTGCTAACACTGATTGATGTCAATGACCATGGCCC AGTCCCTGAGCCCCGTGAGATCACCATCTGCAACCAAGCCCTGTGCGCCAGGTG CTGAACATCACGGACAAGGACCTGTCTCCCCACACCTCCCTTTCCAGGCCCAGC TCACAGATGACTAGACATCTACTGGACGGCAGAGGTCAACGAGGAAGGTGACA CAGTGGTCTTGTCCTGAAGAAGTTCTTGAAGCAGGATACATATGACGTGCACCT TTCTCTGTGACCATGGCAACAAGAGCAGCTGACGGTGTATCAGGGCCACTGTG TGCGACTGCCATGGCCATGTCGAAACCTGCCCTGGACCCCTGGAAAGGAGGTTTCA TCCTCCCTGTGCTGGGGCTGTCTGGGCTCTGCTGTCTCTCTGCTGCTGCTT TTGTTGGTGAGAAAGAACCGGAAGATCAAGGAGCCCCCTCTACTCCCAAGAGAT GACACCGGTGACAACGTCTTCTACTATGGCGAAGAGGGGGTGGCGAAGAGGAC CAGGACTATGACATCACCCAGCTCCACCGAGGTCTGGAGGCCAGGCCGAGGTG					
---	--	--	--	--	--

					<p> GTTCTCCGCAATGACGTGGCACCACCAACCATCATCCCGACACCCATGTACCGTCCTC GGCCAGCCAAACCCAGATGAAATCGGCAACTTTATAATTGAGAACCTGAAGGCGG CTAACACAGACCCACAGCCCCGCCCTACGACACCCCTCTTGGTGTTCGACTATGA GGGCAGCGGCTCCGACGCGCGGTCCCTGAGCTCCCTCACCTCCTCCGCTCCGAC CAAGACCAAGATTACGATTATCTGAACGAGTGGGGCAGCGCTTCAAGAAGCTG GCAGACATGTACGGTGGCGGGGAGGACGAC </p>
3	ECD de CDH3 humana	humano	aa		<p> MGLPRGLASLLQLQCWAASEPCRAVFREAEVTLAEGAEQEPGQALGKVFM GCPGQEPALFSTDNDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVAPI SVPENKGPPFQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLNKP LDREEIAKYELFGHVA SENGASVEDPMNISHVTDQNDHKPKFTQDTFRGSVLEGVLP GTSVMQVTADEDDAIYTYNGVVAYSISHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVISGLDR EKVPEYTLTIQATMDGDGSTTTAVAVVEILDANDNAPMDFDPQKYEAHVPENAVGH EVQRLTVTDLDAPNSPAWRA TYLIMGGDDGDHFTITTHPESNQGILTRKGLDFEAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPVPSKVVEVQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGGQVAVGTLDREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNNGSPPTTGTGTLTLLTLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVNLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVVLSLKKFLKQDTYDVHLSLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGG </p>

4	ECD de CDH3 humana	humano	na	<p>ATGGGGCTCCCTCGTGGACCTCTCGCGTCTCTCCTCCTCTCCAGGTTTGTGGCT GCAGTGC GCGGCTCCGAGCCGTGCCGGGGGTCTTCAGGGAGGCTGAAGTGAC CTTGAGGCGGGAGCGCGGAGCAGAGAGCCGGCCAGGCGCTGGGGAAGTATT CATGGGCTGCCCTGGCAAGAGCCAGCTCTGTTTAGCACTGATAATGATGACTTC ACTGTGCGGAATGGCGAGACAGTCCAGGAAAGAGGTCACTGAAGGAAAGGAA TCCATTGAAGATCTTCCCATCCAAACGTATCTTACGAAGACACAAAGAGAGATTGG GTGGTTGCTCCAATATCTGTCCCTGAAAATGGCAAGGGTCCCTTCCCCCAGAGAC TGAATCAGCTCAAGTCTAATAAAGATAGAGACACCAAGATTTTCTACAGCATCAC GGGGCCGGGGCAGACAGCCCCCTGAGGGTGTCTTCGCTGTAGAGAAAGGAGAC AGGCTGGTTGTTGAATAAGCCACTGGACCGGGAGGAGATTGCCAAGTATGA GCTCTTTGGCCACGCTGTGTCAAGAGAAATGGTGCTCAGTGGAGGACCCCATGAAC ATCTCCATCATCGTGACCGACCAAGATGACCACAAAGCCCCAAGTTTACCCAGGACA CCTTCCGAGGGAGTGCTTAGAGGGAGTCTTACCAGGTACTTCTGTGATGCAGGT GACAGCCACGGATGAGGATGATGCCATCTACACCTACAAATGGGGTGGTTGCTTAC TCCATCCATAGCCAAAGAACCAAGGACCCACACGACCTCATGTTCACCATTCACC GGAGCACAGGCACCATCAGCGTCATCTCCAGTGGCCTGGACCCGGGAAAAAGTCC CTGAGTACACACTGACCATCCAGGCCACAGACATGGATGGGACGGCTCCACCA CCACGGCAGTGGCAGTAGTGGAGATCCTTGATGCCAATGACAATGCTCCCATGTT TGACCCCCAGAAAGTACGAGGGCCCATGTGCTTGAGAATGCAGTGGGCCATGAGGT GCAGAGGCTGACGGTCACTGATCTGGACGGCCCCCAACTCACAGCGTGGCGTGCC ACCTACCTTATCATGGCGGTGACGACGGGGACCATTTTACCATCACCAACCCACC CTGAGAGCAACAGGGCATCTTGACAAACCAAGGAAGGTTTGGATTTTGAGGCCA AAAAACGACACACCTGTACGTTGAAGTGACCAACGAGGCCCTTTGTGCTGAA GCTCCCAACCTCCACAGCCACCATAGTGGTCCACGTGGAGGATGTGAATGAGGC</p>
---	--------------------------	--------	----	---

				<p>ACCTGTGTTTGTCCCACCCCTCCAAAGTCGTTGAGGTCCAGGAGGGCATCCCCACT GGGAGCCCTGTGTGTCTACACTGCAGAAGACCCCTGACAAAGGAGAATCAAAAG ATCAGCTACCGCATCTGAGAGAGACCCAGCAGGGTGGCTAGCCATGGACCCAGAC AGTGGCAGGTCACAGCTGTGGGCACCCCTCGACCCGTGAGGATGAGCAGTTTGTG AGGAACAACATCTATGAAGTCATGGTCTTGGCCATGGACAATGGAAGCCCTCCCA CCACTGGCACGGGAACCCCTTCTGCTAACACTGATTGATGTCAATGACCATGGCCC AGTCCCTGAGCCCCGTGAGATCACCATCTGCAACCAAGCCCTGTGCGCCAGGTG CTGAACATCACGGACAAGGACCTGTCTCCCCACACCTCCCTTTCCAGGCCACG TCACAGATGACTCAGACATCTACTGGACGGCAGAGGTCAACGAGGAAGGTGACA CAGTGGTCTTGTCCCTGAAGAAGTTCTTGAAGCAGGATACATATGACGTGCACCT TTCTGTCTGACCATGGCAACAAAGAGCAGCTGACGGTGATCAGGGCCACTGTG TGC GACTGCCATGGCCATGTCGAAACCTGCCCTGGACCCCTGGAAGGGAGGT</p>
5	CDH3 de macaco	cynomol gus	aa	<p>MGLPRGPLACLLLVQVCWLQCAASEPCRAIFGEAEVTLEAGGAEQEPSQALGVFM GCPGQKPALFSTVNDDFTVQNGETVQDRKSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVAPI SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTRGVSLEGVLP GTSVMQVTATDEDDAIHTYNGVVAYSISHQEPKDPHDLMTHTIRSTGTISVISGLDR EKVPEYTLTIQATMDMDGSGSTTA AVAVVEILDANDNAPVFDPPQKYESHVPENAVGH EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLVGGDDGDHFTIATHPESNQGILTTTRKGLDFAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPVPPSKVVEVQEGIPTGEAV CVYTAKDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGQVTVAGTLDREDEFRVNNIYE VMVLAVDNGSPPTTGTGTLTLLTLDVNDHGPVPEPREITICNQSPESQVLNITDKDLSP HTSPFQAQLTDDSDIYWMAEVNEKDDTVVLSLKKFLKQDTYDVHLSLSDHGNKEQL</p>

6	CDH3 de macaco	cynomolgus	na	<p>TVIRATVDCCHGHEKCPDPWKGGFILPVLGAVLALLLLVLLVLRKKRKVKEPL</p> <p>LLPEDDTRDNVFFYYGEEGGGEEDQDYDITQLHRGLEARPEVVLNRNDVAPTFTPMY</p> <p>RPRPANPDEIGNFIENLKAANTDPTAPPYDSLLVFDYEGSGSDAASLSSLTTSTSDQD</p> <p>QDYDYLNEWGSRFKKLADMYGGGDDD</p>
				<p>ATGGGGTCCCTCGTGGACCTCTCGCGTGTCTCCTCCTCGTCCAGGTTTGTGGCT</p> <p>GCAATGCGGGCCTCCGAGCGTGCCGGCGGATCTTCGGGGAGGCTGAAGTGAC</p> <p>CTTGAGCGGGGAGGCGCGGAGCAGGAGGCCAGCCAGCGCCCTGGGGAAAAGTATT</p> <p>CATGGGTGCCCTGGGCAAAAGCCAGCTCTGTTTAGCACTGTTAATGACGACTTC</p> <p>ACTGTGCAGAAATGGCGAGACAGTCCAGGACAGAAAGTCACTGAAAGAAAAGGAAT</p> <p>CCATTGAAGATCTTCCCATCCAAACGTATCTTACGAAGACACAAGAGAGATTGGG</p> <p>TGGTTGCTCCAAATATCTGTCCCTGAAAAATGGCAAGGGTCCCTTCCCGCAGAGGCT</p> <p>GAATCAGCTCAAGTCTAATAAAGACAGAGACACGAAGATTTTCTACAGCATCAC</p> <p>GGGGCCGGGGCAGACAGCCCCCTGAGGGCGTCTTTGCTGTAGAGAAAGAGAC</p> <p>AGGCTGGTTGTTGTGAACAAAGCCACTGGACCGGGAGGAGATTGCCAAGTATGA</p> <p>GCTCTTTGGCCACGCTGTGCAGAGAAATGGTGCTCAGTGGAGGATCCCATGAAC</p> <p>ATCTCCATCATCGTGACCGACCAGAATGACCAAGCCCAAGTTTACCCAGGACA</p> <p>CCTTCCGAGGGAGTGTCTTAGAGGGAGTCCTACCAGGTACTTCTGTGATGCAGGT</p> <p>GACGGCCACAGATGAGGATGATGCCATCCACACCTACAATGGGGTGGTTGCCGTA</p> <p>CTCCATCCATAGCCAAGAAACCAAGGATCCACACGACCTGATGTTTACCATTAC</p> <p>CGGAGCACAGGCACCATCAGCGTCATCTCCAGCGGCTTGACCGGGGAAAAAGTC</p> <p>CCTGAGTACACACTGACCATCCAGGCCACAGACATGGATGGGGGACGGCTCCACC</p> <p>ACCACGGCAGTGGCAGTAGTGGAGATCCTCGATGCCAATGCAATGCTCCCCGTGT</p> <p>TTGACCCCCAGAAGTATGAGTCCCATGTGCTGTGAGAAATGCAGTGGGCCATGAGGT</p>

GCAGAGGCTGACGGTCACTGATCTGGACGCCCCCAACTCACCAGCGTGGCGTGCC ACCTACCTCATCGTGGCGGTGACGACGGGGACCATTTTACCATCGCCACCCACC CTGAGAGCAACAGGGCATCTTGACACCAGGAAGGTTTGGATTTTGGAGGCCA AAACCAGCACACCTGTAGTTGAAGTGACCAACGAGGCCCTTTTGTGCTGAA GCTCCCAACCTCAACAGCCACCATAGTGGTCCACGTGGAGGATGTGAATGAGGC ACCCGTGTTGTCCCGCCCTCCAAAGTCGTTGAGGTCCAGGAGGCATCCCACT GGGAGGCTGTGTGTCTACACTGCAAAAGACCCCTGACAAAGGAGAATCAAAAG ATCAGTACCCGATCCTGAGAGACCCAGAGGTGGTAGCCATGGACCCAGAC AGTGGCAGGTCACTGTTGCGGGCACCTTAGACCGTGAGGATGAGCGGTTGTG AGAAACAACATCTACGAAGTCATGGTCTTGGCTGTGGACATGGAAGCCCTCCCA CCACTGGCACGGGAACCTCTGTCTAACACTGATTGATGTCAACGACCATGGCCC AGTCCCTGAGCCCCGTGAGATCACCATCTGCAACCACAAAGCCCTGAGTCCCAAGTG CTGAACATCACGGACAAGGACCTGTCCCCCACACCTCCCCCTTTCCAGGCCAGC TCACAGACGACTCAGACATCTACTGGATGGCAGAGGTCAACGAGAAAGATGACA CGTGGTCTTGTCCCTGAAGAAGTTCTGAAGCAGGACACATATGATGTGCACCT TTCTGTCTGACCATGGCAACAGGAGCAGCTGACAGTGATCAGGGCCACCGTG TGTGACTGCCACGGCCATGTGCGAGAAATGCCCTGATCCCTGGAAGGGGGTTTCA TCCTCCCTGTGTGGGGCTGTCTGGCTCTGTCTGTCTCTCTCTGTGTGTGTCTC TTGTTGGTGAGAAAGAGCGGAAGGTCAAGGAGCCCCCTCTACTCCCAAGAGAT GACACCCGTGACAACGTCTTCTACTACGGCGAAGAGGGGTGGCGAAGAGGAC CAGGACTATGACATCACCCAGCTCCACCGAGGTCTGGAGGCCAGGCCGAGGTG GTTCTCCGAATGACGTGGCACCAACCTTCATCCCCACACCCATGTACCGTCTCTC GGCCAGCCCAACCCAGATGAAATCGGCAACTTTATAATCGAGAACCTGGAAGGCAG CTAACACGGGACCCCAACAGCCCCGCCCTACGACTCCCTTTTGGTGTTCGACTATGA					
---	--	--	--	--	--

					GGGAGCGGCTCCGACGCGCGTCCCTGAGCTCCCTCACCACCTCCACCTCTTGAC CAGGACCAAGATTACGACTATCTGAACGAGTGGGGCAGCCGCTTCAAGAAAGCTG GCAGACATGTACGGTGGGGGACGACGAC
7	ECD de CDH3 de macaco	cynomol gus	aa		MGLPRGLACLLLVQVCWLQCAASEPCRAIFGEAEVTLAAGAEQEPSQALGKVF GCPGQKPALESTVNDDFTVQNGETVQDRKSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVA SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTRGVSVLEGVLP GTSVMQV'TATDEDDAIHTYNGVVAYSIIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVSSGLDR EKVPEYTLTIQATDMDGDGSTTTAVAVVEILDANDNAPVFDPPQKYESHVPENAVGH EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLVGGDDGDHFTIATHPESNQGILTRKGLDFEAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPVPPSKVVEVQEGIPTGEAV CVYTAKDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGQVTVAGTLDRIDERFVRNNIYE VMVLAVDNGSPPTTGTGTLTLLTLIDVNDHGPVPEPREITICNQSPESQVNLNITDKDLSP HTSPFQAQLTDDSDIYWMAEVNEKDDTVVLSLKKFLKQDITYDVHLSLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVEKCPDPWKGG
8	ECD de CDH3 de macaco	cynomol gus	na		ATGGGGCTCCCTCGTGGAACCTCTCGCGTGTCTCCTCCTCGTCCAGGTTTGTGGCT GCAATGGCGGGCCTCCGAGCGGTCCCGGGCGATCTTCGGGGAGGCTGAAGTGAC CTTGAGGCGGGAGGCGCGGAGCAGGAGCCCCAGCAGGCCCTGGGGAAGTATT CATGGGCTGCCCTGGGCAAAAGCCAGCTCTGTTTAGCACTGTTAATGACGACTTC ACTGTGCAGAAATGGCGAGACAGTCCAGGACAGAAAAGTCACTGAAAAGAAAGGAAT CCATTGAAGATCTTCCCATCCAAACGTATCTTACGAAAGACACAGAGAGATTGGG TGGTTGCTCCAAATATCTGTCCCTGAAATGGCAAGGTCCTTCCCGCAGAGGCT

				GAATCAGCTCAAGTCTAATAAAGACAGAGACACGAAGATTTTCTACAGCATCAC GGGGCCGGGGCAGACAGCCCCCTGAGGGCGTCTTTTGCTGTAGAGAAAGAGAC AGGCTGGTTGTTTGAACAAGCCACTGGACCGGAGGAGATTGCCAAGTATGA GCTCTTTGGCCACGCTGTGTCTAGAGAAATGGTGCTCAGTGGAGATCCCATGAAC ATCTCATCATCGTGACCGACCAAGAAATGACCACAAGCCCAAGTTTACCCAGGACA CCTCCGAGGGAGTGTCTTAGAGGGAGTCTTACCAGGTACTTCTGTGATGCAGGT GACGGCCACAGATGAGGATGATGCCATCCACACCTACAATGGGGTGGTTGCCGTA CTCCATCCATAGCCAAGAACCAAGGATCCACACGACCTGATGTTTACCATTCAC CGGAGCACAGCACCATCAGCGTCACTCCAGCGGCTGGACCGGGAAAAAGTCTC CCTGAGTACACACTGACCATCCAGGCCACAGACATGGATGGGACGCTCCACC ACCACGGCAGTGGCAGTAGTGGAGATCCTCGATGCCAATGACAATGCTCCCGTGT TTGACCCCCAGAAAGTATGAGTCCATGTGCTGTGAGAAATGACGTGGGCCATGAGGT GCAGAGGCTGACGGTCACTGATCTGGACGCCCCCAACTCACAGCGTGGCGTGCC ACCTACCTCATCTGTGGCGGTGACGACGGGGACCATTTTACCATCGCCACCCACC CTGAGAGCAACCAAGGGCATCTTGACAACCAAGGAAGGTTTGATTTTGAGGCCA AAAACACACACCTGTACGTTGAAGTGACCAATGAGGCCCTTTTGTGCTGAA GCTCCCAACCTCAACAGCCACCATAGTGGTCCACGTGGAGGATGTGAATGAGGC ACCGTGTTTGTCCCGCCCTCCAAAAGTCGTTGAGGTCCAGGAGGGCATCCCCACT GGGGAGGCTGTGTGTCTACACTGCACAAAGACCCCTGACAAGGAGAATCAAAAG ATCAGCTACCCGCATCCTGAGAGACCCAGCAGGGTGGTAGCCATGGACCCAGAC AGTGGGCAGGTCACTGTTGGGGCACCCCTAGACCGGTGAGGATGAGCGGTTTGTG AGAAACAACATCTACGAAGTCATGGTCTTTGGCTGTGGACAATGGAAAGCCCTCCCA CCACTGGCACGGGAACCCCTCCTGTACACTGATTGATGTCAACGACCATGGCCC AGTCCCTGAGCCCCGTGAGATCACCATCTGCAACCAAGCCCTGAGTCCCAGGTG

					CTGAACATCAGGACAAAGGACCTGTCCCCCACCCTCCCTTTCCAGGCCAGC TCACAGACGACTCAGACATCTACTGGATGGCAGAGGTCAACGAGAAAGATGACA CGGTGCTTGTCCCTGAAGAAAGTTCTGAAGCAGGACACATATGATGTGCACCT TTCTCTGTCTGACCATGGCAACAAGGAGCAGCTGACAGTGATCAGGGCCACCGTG TGTGACTGCCACGGCCATGTGAGAAATGCCCTGATCCCTGGAAGGGGGGT
9	CDH3 murina	murino	aa		MELLSGPHAFLLLLQVCWLRVVSSEPYRAGFIGEAGVTLEVEGTDLEPSQVLGKVA LAGQGMHHADNGDIIMLTRGTVQGGKDAAMHSPTRILRRRKREWVMPPIFVPENCK GPFQRLNQLKSNKDRGTFKIFYSITGPGADSPPEGVFTIEKESGWLLHMLPLDREKIVK YELYGHAVSENGASVEEPMNISIIVTDQNDNPKPKFTQDTRGVSLEGVMPGTSVMQV TATDEDDAVNTYNGVVAYSIIHSQEPKEPHDLMFTIHKSTGTISVISSGLDREKVPEYR LTVQATDMDGEGSTTTAEA VVQILDANDNAPEFEPQKYEA WVPENEVGHEVQRLTV TDLDVPNSPAWRATYHIVGGDDGDHFTTTTHPETNQGVLTTKKGLDFAEQDQHTLY VEVTNEAPFAVKLPTATATV VHVVDVNEAPVFVPPSKVIEAQEGISIGELVCIYTAQ DPDKEDQKISYTSIRDPANWLAVDPDSGQITAA GILDREDEQFVKNNVYEVVMVLATD SGNPPTTGTGTLTLLTDINDHGPIEPRQIICNQSPVQVNLNITDKDLSPNSSPFQAQL THDSDIYWMAEVSEKGDVVALSLKKFLKQDITYDLHLSLSDHGNREQLT MIRATVCD CHGQVFENDCPRPWKGGFILPILGAVLALLTLLALLLVRKKRKVKEPLLLPEDDTRD NVFYYGEEGGGEEDQDYDITQLHRGLEARPEVVLNRNDVVPTFTPMYRPRPANPDEI GNFIHENLKAANTDPTAPPYDSLLVFDYEGSGSDAASLSSLTTSASDQDQDYNYLNEW GSRFKKLADMYGGGEDD
10	CDH3 murina	murino	na		ATGGAGCTTCTTAGTGGGCCTCAGCCCTTCTGCTCCTCTGCTCCAGGTTTGCTG GCTACGCAGCGTGTCTCCGAGCCCTACCGAGCGGGCTTCATCGGGGAGGCTGG

AGTGACCTTGGAGGTGGAAGAACTGACCTGGAGCCGAGCCAAGTTCTGGGGAA				
AGTAGCCTTGGCTGGACAGGGCATGCACCATGCAGACAATGGAGACATCATTTAT				
GCTGACTAGGGGACAGTTCAGGGAGGGAAGAGATGCGATGCACTCCCAACCCAC				
CCGCATCTTAAGGAGACGAAAGAGAGAGTGGTGATGCCACCAATATTCTGTCCC				
CGAGAAATGGCAAGGGTCCCTTCCTCAGAGGCTGAATCAGTCAAAATCTAATAAG				
GACAGAGGCACCAAGATTTTCTACAGCATCACAGGCTGGCCGACAGAGTCCC				
CCCGAAGGAGTCTTCAACCATAGAGAAGGAGTCGGCTGGCTGTTGTTCATATGC				
CACCTGGACAGGGAGAAGATTGTCAAGTACGAGCTTTATGGCCACGCTGTATCTGA				
GAATGGTGCCTCTGTAGAGGAGCCCCATGAACATATCCATCATTTGTACAGACCAG				
AATGACAACAAGCCCAAGTTCACTCAAGACACCTTTCAGAGGGAGTGTCTGGAG				
GGAGTAATGCCTGGCACTTCTGTGATGCAGGTGACAGCCACAGATGAGGACGAT				
GCTGTCAACACTTACAAATGGGGTGGTGGCTTACTCCATCCATAGCCAAGAGCCGA				
AGGAGCCACACGACCTCATGTTCAACCATCCATAAAAGCACGGGAACCATTAGCG				
TCATATCCAGTGGCCTGGACCGAGAGAGAAAGTCCCTGAGTACAGACTGACCGTCCA				
GGCCACAGACATGGATGGAGAGGGCTCTACCACGACGGCAGAGGGCCGTTGTGCA				
AATCCTTGATGCCAACGATAACGCTCCGAGTTTGAGCCGCAGAAAGTATGAGGCT				
TGGTGCCTGAGAACGAAGTGGCCATGAGGTACAGAGGCTGACAGTGAAGTATGAT				
CTCGATGTCCCCAACTCGCCAGCGTGGCGTGCCACCTACACATCGTGGGAGGTG				
ATGATGGGGACCATTTTCACCATCACCACTCACCCAGAGACCACCAAGGCGTCT				
GACAAACCAAGAAGGGTTTGGATTTTGAGGCTCAGGACCAACACACCCCTGTATGTA				
GAAGTGACCAACGAGGCTCCCTTTGCAGTGAAGCTCCCGACAGCCACTGCCACCG				
TGGTGGTCCATGTGAAAGATGTCAACGAAGCCCCCTGTGTTTGTCCACCTTCCAA				
GGTCATTGAGGGCCAGGAAGGCATCTCTATTGGGGAACTGGTCTGCATCTATACC				
GCACAGGACCCAGACAAGGAGGACCAAGAAATCAGCTACACCATCTCGAGAGAT				

				<p>CCAGCCAACTGGCTTGCTGTGGACCCAGACAGTGGTCAGATAACTGCCGCAGGC ATCTTGATCGTGAGGACGAGCAGTTTGTGAAAAACAATGTCTACGAAGTCATGG TTTTGGCCACAGACAGTGGAAACCCCTCCACACCGGCACTGGGACCCCTCCTGCT TACACTTACTGACATCAACGACCAATGGCCCGATCCCTGAACCCAGGCAGATCATC ATCTGTAAACCAAGCCCTGTGCCTCAAGTGTGAACATCACTGACAAGGACCTGT CCCCAACTCCTCCCTTTCCAGGCCAGCTAACACATGACTCAGATATCTACTG GATGGCAGAAAGTCAGCGAGAAAGGAGACACCGTGGCCTTGTCCCTGAAGAAAGTT CCTGAAACAAGACACGTATGACTTGCACTTTTCTTTGTCTGACCATGGCAACAGG GAACAGCTAACCATGATCAGGGCCACTGTGTGTGACTGCCATGGCCAAAGTTTCA ATGACTGCCCCAGACCTGGAAAGGTGGTTTCAATCCTCCCCATCCTGGGTGCTGT CCTGGCACTGTGACCTTCTACTGGCACTCCTCCTGTTGGTGAGGAAGAGAGG AAGGTCAAAGAGCCCCCTTCTGCTCCAGAAAGATGACACGCGAGACAATGTCTTCT ATTATGGAGAAAGGGTGTGGTGAAGAGGACCAGGACTATGACATCACCCAAAC TCCACCGGGGACTGGAGGCCAGGCCTGAGTGGTTCTCCGAAACGATGTAGTGC CAACCTTCATCCCCACCCCATGTACCGACCCCGCCGCCAACCCAGATGAAAT CGGGAACCTTCATCATCGAGAACCTGAAGGCTGCCAACACTGACCCCTACTGCCCCG CCCTACGACTCCCTGCTGTTTTTTGACTACGAGGGCAGCGGCTCTGATGCCGCCT CCCTGAGCTCCCTCACCACTCCGCCTCCGACCAAGGATCAGGACTACAACTACCT TAACGAGTGGGAAAGTCGATTCAAGAAACTGGCGGACATGTATGTTGGCGGTGA GGATGACTAG</p>
11	CDH3 murina	murino	aa	<p>EWVMPPIFVPENKGPFPPQRLNQLKSNKDRGTFKIFYSITPGADSPPEGVFTIEKESG WLLHMLPLDREKIVKYELYGHAVSENGASVEEPMNISHVTDQNDNKPFTQDTRFG SVLEGVMPGTSMQVTADEDDA VNTYNGV VAYSIHSQEPKEPHDLMFTIHKSTGTI</p>

					SVISSGLDREKVPEYRLTVQATMDMGEGSTTTAEAVVQILDANDNAPEFEPQKYEA VPENEVGHEVQRLTVTDLDVPNSPAWRATYHIVGGDDGHFTTTHPETNQGVLT TKGLDFEAQDQHTLYVEVTNEAPFAVKLPTATATVHVVKDVNEAPVFPSPK VIEAQEGISIGELVCYITAQDPDKEDQKISYTIISRD PANWLA VDPDSGQIT AAGILDREREQFVKNNVYEVMLATDSGNPPTTGTGTLTLLTLTDINDH GPIPEPRQIHCNQSPVPQVLNITDKDLSPNSSPFQAQLTHDSDIY WMAEVSEKGDVTVALSKKFLKQDTYDLHLSLSDHGNREQLTMIRATV CDCCHGQVFNDCPRPWKGG
12	ECD de CDH3 murina	murino	na		GAGTGGGTGATGCCACCAATATTCTGCCCGAGAAATGGCAAGGGTCCCTC CTCAGAGGCTGAATCAGCTCAAATCTAATAAGGACAGAGGCCACCAAGAT TTTCTACAGCATCACAGGGCCTGGCGCAGACAGTCCCCCGAAGGAGTCTT CACCATAGAGAAGGAGTCGGCTGGCTGTTGTCATATGCCACTGGACAGG GAGAAATTGTCAAGTACGAGTGTGAGGGAGTAAATGCCCTGGCACTTCT GTGATGCAGGTGACAGCCACAGATGAGGACGATGCTGTCAACACTTACA ATGGGGGTGGTGGCTTACTCCATCCATAGCCAAAGAGCCGAAGGAGCCAC ACGACCTCATGTTCCATATAAGCGTCAATATCCAGTGGCCTGGACCCGAG AGAAAGTCCCTGAGTACAGACTGACCGTCCAGGCCACAGACATGGATGG AGAGGGCTCTACACGAGCGCAGAGGCCGTTGTGCAAAATCCTTGATGCC AACGATAACGCTCCCGAGTTTGAGCCGCAGAAAGTATGAGGCTTGGGTG GCTGAGAACGAAAGTGGGCATGAGGTACAGAGCTGACATCGTGGGAGGT GATGATGGGACCATTTCCACCATCAC

				<p>GAGGCTCAGGACCAACACACCCCTGTATGTAGAAGTGACCAACGAGGCTCCCTTTG CAGTGAAAGCTCCCGACAGCCACTGCCACCGTGGTGGTCCATGTGAAAAGATGTCAA CGAAGCCCTGTGTTTGTCCACCTTCCAAGGTCAATTGAGGCCACGAAAGGCATC TCTATTGGGGAACCTGGTCTGCATCTATACCGCACAGGACCCAGACAAGGAGGAC CAGAAAGATCAGCTACACCATCTCGAGAGATCCAGCCAACTGGCTTGTGTGGACC CAGACAGTGGTCAGATAACTGCCGAGGCATCTTTGGATCGTGAAGACGAGCAGT TTGTGAAAACAATGTCTACGAAGTCATGTTTGGCCACAGACAGTGGAAACCC TCCCACCAACCGGCACTGGGACCTCCTGCTTACACTTACTGACATCAACGACCAT GGCCCGATCCCTGAACCCAGGCAGATCATCTGTAAACCAAGCCCTGTGCCTC AAGTGTGAACATCACTGACAAGGACCTGTCCCCCAACTCCTCCCTTTCCAGGC CCAGCTAACACATGACTCAGATATCTACTGGATGGCAGAAAGTCAGCGAGAAAGG AGACACCGTGGCCTTGCCCTGAAGAAAGTTCTTGAAACAAAGACACGTATGACTTG CATCTTCTTTGTCTGACCATGGCAACAGGAACAGCTAACCATGATCAGGGCCA CTGTGTGTGACTGCCATGGCCAAGTGTTCATGACTGCCCCCAGACCCCTGGAAGGG TGGT</p>
13	CDH3 Hu Dom1 mu (aa 108- 215)	hu/mu químérico	aa	<p>MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEVTLEAGAEQEPGQALGKVF M GCPGQEPALFSTDNDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKREWVMPPI FVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRGKIFYSITGPGADSPPEGVFIEKESGWLLHMP LDREKIVKYELYGHAVSENGASVEEPMNISIIVTDQNDNPKFTQDTRGSVLEGVLP GTSVMQVTADEDDAIYTYNGVVAYSISHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVISSGLDR EKVPEYTLTIQATDMDGDGSTTTAAVAVVEILDANDNAPMFDPOKYEAHVPENAVGH EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLMGGDDGDHFTTTHPESNQILTTTRKGLDFAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVVEDVNEAPVFVPPSKVVEVQEGIPTGEPV</p>

					<p>CVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGQVTA VGTL DREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNGSPPTTGTGTLTLLTLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVNLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVVL SLKKFLKQDTYDVHLSLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGGAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVISRKK RMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA</p>
14		CDH3 Hu Dom1A mu (aa 108-143)	hu/mu químérico	aa	<p>MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREA EVTLEAGGA EQPGQALGKVFM GCPGQEPALFSTDND DFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKREWVMPPI FVPENGKGPPQRLNQLKSNKDRGTKIFYSITGP GADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGH AVSENGASVEDPMNISIIVTDQN DHPKPKFTQDTFRGSVLEGVLP GTSVMQVTA TDEDDAIYTYNGVVAYSISHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVISGLDR EKVPEYTLTIQATMDMGDGSTTTAVAVVEILDANDNAPMFDPPQKYEAHVPENAVGH EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLMGGDDGDHFTITTHPESNQGILTRKGLDFAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLP TSTATIVVHVEDVNEAPVFVPPSKVVEVQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGQVTA VGTL DREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNGSPPTTGTGTLTLLTLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVNLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVVL SLKKFLKQDTYDVHLSLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGGAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVISRKK RMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA</p>
15		CDH3 Hu Dom1B mu (aa 144-179)	hu/mu químérico	aa	<p>MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREA EVTLEAGGA EQPGQALGKVFM GCPGQEPALFSTDND DFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVAPI SVPENGKGPPQRLNQLKSNKDRDRTKIFYSITGP GADSPPEGVFTIEKESGWLLLHMP LDREKIVKYELFGH AVSENGASVEDPMNISIIVTDQN DHPKPKFTQDTFRGSVLEGVLP</p>

					<p>GTSMQVATDEDDAIYTYNGVVAYSIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVSSGLDR EKVPEYTLTIQATDMDDGGSTTTTAVAVVEILDANDNAPMFDPPQYEAHV/PENAVGH EVQRLTV/TDLDA/PNSPAWRATYLMGGDDGDHFTITTHPESNQGILTTTRKGLDFAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPPSKVVEVQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGGQVTA/VGLDREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNGSPPTTGTGLLLTLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVVLSLKKELKQDITYDVHLSLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGGAGVIAVIVVVVIAVAGIVVLVISRKK RMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA</p>
16	CDH3 Hu Dom1C mu (aa 180-215)	hu/mu químérico	aa		<p>MGLPRGLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEVTLAAGAEQEPGQALGKVFEM GCPGQEPALFSTDNDDDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVAPI SVPENGKGPPQRLNQKSNKDRDTKIFYSITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLNKP LDREEIAKYELYGHA VSENGASVEEPMNISIIVTDQNDNPKPKFTQDTRGSLVLEGVLP GTSMQVATDEDDAIYTYNGVVAYSIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVSSGLDR EKVPEYTLTIQATDMDDGGSTTTTAVAVVEILDANDNAPMFDPPQYEAHV/PENAVGH EVQRLTV/TDLDA/PNSPAWRATYLMGGDDGDHFTITTHPESNQGILTTTRKGLDFAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPPSKVVEVQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGGQVTA/VGLDREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNGSPPTTGTGLLLTLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVVLSLKKELKQDITYDVHLSLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGGAGVIAVIVVVVIAVAGIVVLVISRKK RMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA</p>

17	CDH3 Hu Dom2 mu (aa 216-327)	hu/mu químérico	aa	MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEVTLAAGAEQEPGQALGKVFM GCPGQEPALFSTDNDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVA SVPENGKGPPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTRGVSVEGVMP GTSVMQVTADEDDAVNTYNGVVAYSISHSQEPKEPHDLMFTIHKSTGTISVSSGLDR EKVPEYRLTVQATMDGEGSTTTAEAVVQILDANDNAPEFDPQKYEAHVPENAVGH EVQRLTVTDLDA PNSPAWRATYLMGGDDGDHFTTTTHPESNQGILTTTRKGLDFAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPSPKVVVEVQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPPDSGQVTA VGTLDREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNGSPPTTGTGTLTLLTLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVLSLKKFLKQDITYDVHLSLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGGAGVIAVIVVVIAIVAGIVLVISRKK RMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA
18	CDH3 Hu Dom2A mu (aa 216-252)	hu/mu químérico	aa	MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEVTLAAGAEQEPGQALGKVFM GCPGQEPALFSTDNDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVA SVPENGKGPPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTRGVSVEGVMP GTSVMQVTADEDDAVNTYNGVVAYSISHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVSSGLDR EKVPEYTLTIQATMDGDDGSTTTAVAVVEILDANDNAPMFDQKYEAHVPENAVGH EVQRLTVTDLDA PNSPAWRATYLMGGDDGDHFTTTTHPESNQGILTTTRKGLDFAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPSPKVVVEVQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPPDSGQVTA VGTLDREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNGSPPTTGTGTLTLLTLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVLNITDKDLS

19						<p>PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVVL SLKKFLKQDTYDVHLSLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGAGVIAVIVVVVIAVAGIVVLVISRKK RMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA</p> <p>MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEVTLEAGGAEQEPGQALGKVF GCPGQEPALFSTDNDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVA SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNK LDREEIAKYELFGHVAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTRFGSVLEGVLP GTSVMQVTAATDEDDAIYTYNGVVAYSIHSQEPKEPHDLMFTTHKSTGTISVSSGLDR EKVPEYTLTIQATMDMGDGSTTTAVAVVEILDANDNAPMDFDPQKYEAHVAVPENAVGH EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLMGGDDGDHFTTTHPESNQILTRKGLDFAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLTSTATIVVHVEDVNEAPVFPSPKVVVEVQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGQVTAVGTLDREREQFVRNNIYE VMVLAMDNNGSPPTTGTGTLTLLTLDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVNLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVVL SLKKFLKQDTYDVHLSLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGAGVIAVIVVVVIAVAGIVVLVISRKK RMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA</p>
20						<p>MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEVTLEAGGAEQEPGQALGKVF GCPGQEPALFSTDNDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVA SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNK LDREEIAKYELFGHVAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTRFGSVLEGVLP GTSVMQVTAATDEDDAIYTYNGVVAYSIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVSSGLDR EKVPEYRLTVQATMDMGEGSTTTAEAVVQILDANDNAPDFDPQKYEAHVAVPENAVGH</p>

				EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLMGGDDGDHFTTTHPESNQGILTTTRKGLDFEAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPVPPSKVVEVQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGQVTAAGTLDREREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNNGSPPTTGTGTLTLLTLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVNLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVLSLKKFLKQDTYDVHLSLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGGAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVISRKK RMAKYEKAIEIKEMGEMHRELNA
21	CDH3 Hu Dom3 mu (aa 328-440)	hu/mu químérico	aa	MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEVTLEAGGAEQEPGQALGKVFM GCPGQEPALFSTDNDDDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVAPI SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIVTDQNDHKPKFTQDTFRGSVLEGVLP GTSVMQVTAATDEDDAIYTYNGVVAYSISHSQEPKDPHDLMTHTHRSTGTISVSSGLDR EKVPEYTLTIQATMDMDGDSITTA VAVVEILDANDNAPMFEPQKYEA WVPENEVGH EVQRLTVTDLDVNPNSPAWRATYHIVGGDDGDHFTTTHPESNQGILTTTRKGLDFEAK DQHTLYVEVTNEAPFAVKLPTATATVHVHVKDVNEAPVFPVPPSKVVEVQEGIPTGEP VCVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGQVTAAGTLDREREDEQFVRNNIY EVMVLAMDNNGSPPTTGTGTLTLLTLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVNLNITDKDL SPHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVLSLKKFLKQDTYDVHLSLSDHGNKEQ LTVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGGAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVISRK KRMAYEKAIEIKEMGEMHRELNA
22	CDH3 Hu Dom3A mu	hu/mu químérico	aa	MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEVTLEAGGAEQEPGQALGKVFM GCPGQEPALFSTDNDDDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVAPI

		(aa 328-363)		<p>SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDRTKIFYSITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTRGVSVEGLVLP GTSVMQVATATDEDDAIYTYNGVVAYSIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVISSGLDR EKVPEYTLTIQATMDGDGSTTTAAVAVVEILDANDNAPMFEQPKYEAWVPENEVUGH EVQRLTVTDLDVPNSPAWRATYLMGGDDGDHFTTTHPESNQGLTTRKGLDFAEK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPVPPSKVVEVEQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGQVAVGTLDDREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNGSPPTTGTGTLTLLTLDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVNLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDVTVLSLKKFLKQDITYDVHLSLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGGAGVIAVIVVVVIAVAGIVVLVISRKK RMAKYEKAIEIKEMGEMHRELNA</p>
23	CDH3 Hu Dom3B mu (aa 364-403)	hu/mu químérico	aa	<p>MGLPRGPLASLLLLQVCWQLQCAASEPCRAVFREAQVLEAGAEQEPGQALGKVFMM GCPGQEPALFSTDNDDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVAPI SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDRTKIFYSITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTRGVSVEGLVLP GTSVMQVATATDEDDAIYTYNGVVAYSIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVISSGLDR EKVPEYTLTIQATMDGDGSTTTAAVAVVEILDANDNAPMFDQPKYEAHVPENAVUGH EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYHIVGGDDGDHFTTTHPETNQGVLTTRKGLDFAEQ DQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPVPPSKVVEVEQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGQVAVGTLDDREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNGSPPTTGTGTLTLLTLDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVNLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDVTVLSLKKFLKQDITYDVHLSLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGGAGVIAVIVVVVIAVAGIVVLVISRKK</p>

					<p>RMAYEKAIEKEMGEMHRELNA</p> <p>MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEVTLAAGAEQEPGQALGKVFVM GCPGQEPALFSTDNDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVA SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTRFGSVLEGVLP GTSVMQV/TATDEDDAIYTYNGVVAAYSIHSQEPKDPHDLMTFTHIRSTGTISVSSGLDR EKVPEYTLTIQATMDMDGSGSTTTAVA VVEILDANDNAPMFDPPQKYEAHVPENAVGH EVQRLTVTDLDA PNSPAWRATYLMGGDDGDHFTTTHPESNQGLTTRKGLDDEAK NQHTLYVEVTNEAPFAVKLPTATATV VVHV/KDVNEAPVFPVPPSKVVEVQEGIPTGEP VCVYTAEDPPKENQKISYRILRDPAGWLAMDPPDSGQVTA VGTLDREDEQFVRNNIY EVMVLAMDNGSPPTTGTGTLTLLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVNLNITDKDL SPHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTV VLSLKFLKQDITYDVHL/SLSDHGNKEQ LTVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGSGAGVIAIVV VVIAIVAGIVVLVISRK KRMAYEKAIEKEMGEMHRELNA</p>
24			CDH3 Hu Dom3C mu (aa 404- 440)	hu/mu químérico aa	<p>MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEVTLAAGAEQEPGQALGKVFVM GCPGQEPALFSTDNDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVA SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTRFGSVLEGVLP GTSVMQV/TATDEDDAIYTYNGVVAAYSIHSQEPKDPHDLMTFTHIRSTGTISVSSGLDR EKVPEYTLTIQATMDMDGSGSTTTAVA VVEILDANDNAPMFDPPQKYEAHVPENAVGH EVQRLTVTDLDA PNSPAWRATYLMGGDDGDHFTTTHPESNQGLTTRKGLDDEAK NQHTLYVEVTNEAPFAVKLPTATATV VVHV/VVEDVNEAPVFPVPPSKVVEAQEGISIGELVC</p>
25			CDH3 Hu Dom4 mu (aa 441- 546)	hu/mu químérico aa	<p>MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEVTLAAGAEQEPGQALGKVFVM GCPGQEPALFSTDNDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVA SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTRFGSVLEGVLP GTSVMQV/TATDEDDAIYTYNGVVAAYSIHSQEPKDPHDLMTFTHIRSTGTISVSSGLDR EKVPEYTLTIQATMDMDGSGSTTTAVA VVEILDANDNAPMFDPPQKYEAHVPENAVGH EVQRLTVTDLDA PNSPAWRATYLMGGDDGDHFTTTHPESNQGLTTRKGLDDEAK NQHTLYVEVTNEAPFAVKLPTATATV VVHV/VVEDVNEAPVFPVPPSKVVEAQEGISIGELVC</p>

26						<p>IYTAQDPDKEDQKISYTTISRDPANWLA VDPDSGQITAA GILDREDEQFVKNNVYEV VLA TDSGNPPTTGTGTLTLLTLDINDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVLNITDKDLSPTHT SPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVLSLKKFLKQDITYDVHLSLSDHGNKEQLTVI RATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGGAGVIAVIVVVVIAVAGIVVLVISRKKRM AKYEKAEIKEMGEMHRELNA</p> <p>MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREA E VTL EAGGAEQEPGQALGKVFM GCPGQEPALFSTDND DFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFFSKRILRRHKRDWVVAPI SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGH A VSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDIFRGSVLEGVLP GTSVMQVTA TDEDDAIYTYNGVVAYSIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVISGLDR EKVPEYTLTIQATMDGDGSTTTAVAVVEILDANDNAPMFDPPQKYEAHVPENAVGH EVQRLTVTDL DAPNSPAWRATYLMGGDDGDHFTTITHPESNQGILTTTRKGLDFAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPVPSKVIEAQEGISIGELVC IYTAQDPDKEDQKISYRILRDPAGWLAMD PDSGQVTA VGTLDREDEQFVRNNIYEV MVLAMDNGSPPTTGTGTLTLLTLDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVLNITDKDLS HTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVLSLKKFLKQDITYDVHLSLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGGAGVIAVIVVVVIAVAGIVVLVISRKK RMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA</p>
27						<p>MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREA E VTL EAGGAEQEPGQALGKVFM GCPGQEPALFSTDND DFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFFSKRILRRHKRDWVVAPI SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGH A VSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDIFRGSVLEGVLP</p>

					<p>GTSVMQVTA TDEDDAIYTYNGVVA YSIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVISSGLDR EKVPEYTLTIQA TMDGDS TTTTAA VAVVEILDANDNAPMFDPPQKYEAHV PENAVGH EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLMGGDDGDHFTITTHPESNQGLTTRKGLDFAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPSPKVVEVQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISY TISRD PANWLA VDPDSGQITAA GILDREDEQFVKNNIYEV MVLAMDNGSPPTTGTG TLLLTLLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQV L NITDKDLS HTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVVL SLKKFLKQDTYDVHL SLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGGAGVIAVIVVVVIAVAGIVVLVISRKK RMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA</p>
28	CDH3 Hu Dom4C mu (aa 512-546)	hu/mu químico	aa		<p>MGLPRGPLAS LLLQVCW LQCAASEPCRA VFREAEV TLEAGGAEQEPGQALGKVFM GCPGQEPALFSTDND DFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVAPI SVPENGGKGFPPQRLNQLKSNKDRDTKIFY SITGPADSPPEGVFAVEKETGWLLNKP LDREEIAKYELFGH AVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQD TFRGSVLEGVLP GTSVMQVTA TDEDDAIYTYNGVVA YSIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVISSGLDR EKVPEYTLTIQA TMDGDS TTTTAA VAVVEILDANDNAPMFDPPQKYEAHV PENAVGH EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLMGGDDGDHFTITTHPESNQGLTTRKGLDFAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPSPKVVEVQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISY RILRDPAGWLAMDPSGQVTA VGTLDREDEQFVRNNVYE VMVLATDSGNPPTTGTG TLLLTLLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQV L NITDKDLS HTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVVL SLKKFLKQDTYDVHL SLSDHGNKEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGGGGGGAGVIAVIVVVVIAVAGIVVLVISRKK RMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA</p>

29	CDH3 Hu Dom 5 mu (aa 547-650)	hu/mu químérico	aa	MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEEVTLAAGGAEEQEPGQALGKVF MGCPEPALFSTDNDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVA PI SVPENGKGFPPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITPGADSPPEGVFAVEKETGWLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTFRGSVLEGLP GTSVMQVTADEDDAIYTYNGVVAAYSIHSQEPKDPHDLMTFTHIRSTGTISVISSGLDR EKVPEYTLTIQATMDGDGSTTTTAAVVEILDANDNAPMFDPKQYEAHVPENAVGH EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLMGGDDGDHFTTTHPESNQGLTTRKGLDFAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPSPKVVVEVEQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGGQVTAAGTLDREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNGSPPTTGTGTLTLLTLIDVNDHGPIPEPRQIICNCQSPVPQVLTITDKDLSP NSSPFQAQLTHDSDIYWMAEVSEKGDVVALSKKFLKQDQTYDLHLSLSDHGNREQ L TMIRATVCDCHGQVFENDCPRPWKGGGGGAGVIAVIVVVIAIVAGIVVLVISR KKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA
30	CDH3 Hu Dom 5A mu (aa 547-581)	hu/mu químérico	aa	MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEEVTLAAGGAEEQEPGQALGKVF MGCPEPALFSTDNDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVA PI SVPENGKGFPPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITPGADSPPEGVFAVEKETGWLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTFRGSVLEGLP GTSVMQVTADEDDAIYTYNGVVAAYSIHSQEPKDPHDLMTFTHIRSTGTISVISSGLDR EKVPEYTLTIQATMDGDGSTTTTAAVVEILDANDNAPMFDPKQYEAHVPENAVGH EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLMGGDDGDHFTTTHPESNQGLTTRKGLDFAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFPSPKVVVEVEQEGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGGQVTAAGTLDREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNGSPPTTGTGTLTLLTLIDVNDHGPIPEPRQIICNCQSPVPQVLTITDKDLSP

					NSSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVVLSLKKFLKQDTYDVHLSLSDHGNKEQLT VIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGSGGGGAGVIAVIVVVIAVAGIVVLVISRKK RMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA
31	CDH3 Hu Dom5B mu (aa 582- 616)	hu/mu químérico	aa		MGLPRGPLASLLLLQVCWLCQAASEPCRAVFREAETLEAGGAEQEPGQALGKVFM GCPGQEPALFSTDNDDDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVAPI SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITGPADSPPGVEFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTFRGSVLEGVLP GTSVMQVTTATDEDDAIYTYNGVVAYSIIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVISSGLDR EKVPEYTLTIQATMDMDGDGSTTTAVAVVEILDANDNAPMFDPPQKYEAHVPENAVVGH EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLMGGDDGDHFTITTHPESNQILTTTRKGLDFEAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTSTATIVVHVEDVNEAPVFVPPSKVVEVEQGIPTGEPV CVYTAEDPDKENQKISYRIILRDPAGWLAMDPSGQVTA VGTLDREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNGSPPTTGTGTLTLLTLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVLNITDKDLS PHTSPFQAQLTHDSDIYWMAEVSEKGDVTVALSKKFLKQDTYDVHLSLSDHGNKEQ LTVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGSGGGGAGVIAVIVVVIAVAGIVVLVISRK KRMAYEKAIEIKEMGEMHRELNA
32	CDH3 Hu Dom5C mu (aa 617- 650)	hu/mu químérico	aa		MGLPRGPLASLLLLQVCWLCQAASEPCRAVFREAETLEAGGAEQEPGQALGKVFM GCPGQEPALFSTDNDDDFTVRNGETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVAPI SVPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITGPADSPPGVEFAVEKETGWLLLNKP LDREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQDTFRGSVLEGVLP GTSVMQVTTATDEDDAIYTYNGVVAYSIIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVISSGLDR EKVPEYTLTIQATMDMDGDGSTTTAVAVVEILDANDNAPMFDPPQKYEAHVPENAVVGH

					EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLMGGDDGDHFTTTHPESNQGLTTRKGLDFEAK NQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFVPPSKVVEVQEGIPTGEPV CVYTAEPPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGQVTAVGTLDDREDEQFVRNNIYE VMVLAMDNGSPPTTGTGTLTLLTLIDVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVNLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVLSLKKFLKQDQTYDLHLSLSDHGNREQL TMIRATVCDCHGQVFNDCPRPWKGGGGGGGAGVIAIVVVIAIVAGIVVVISR KKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA
33		Agrupación de epítomos humanos D1B	humano	aa	SITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKPLDREEIA
34		Agrupación de epítomos humanos D2C	humano	aa	VPEYTLTIQATMDMDGDGSTTTAVAVVEILDANDNAPM
35		Agrupación de epítomos humanos D3A	humano	aa	FDPQKYEAHVPENAVGHEVQRLTVTDLDAPNSPAWR

36		Agrupaciones de epítomos humanos D2C+D3A	humano	aa	VPEYTLTIQATMDGDGSTTTTAVAVVEILDANDNAPMFDPPQKYEAHVPEHAVGHEV QRLTVTDLDAPNSPAWR
37		Agrupación de epítomos de macaco D1B	cynomol gus	aa	SITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKPLDREEIA
38		Agrupación de epítomos de macaco D2C	cynomol gus	aa	VPEYTLTIQATMDGDGSTTTTAVAVVEILDANDNAPV
39		Agrupación de epítomos de macaco D3A	cynomol gus	aa	FDPQKYESHVPEHAVGHEVQRLTVTDLDAPNSPAWR
40		Agrupaciones de epítomos de macaco D2C+D3A	cynomol gus	aa	VPEYTLTIQATMDGDGSTTTTAVAVVEILDANDNAPVFDPPQKYESHVPEHAVGHEV QRLTVTDLDAPNSPAWR

41	CDH1 humana (E- cad.)	humano	aa	<p>MGPWSRSLALLLLQVSSWLCQEPECHPGFDAESYTFTVPRRHLRGRVLRVNF EDCTGRQRTAYFSLDTRFKVGTGVTVKRPLRFHNPQHFLVYAWDSTYRKFKSTKV TLNTVGHHRPPPHQASVSGIAELLTFPNSSGLRRQKRQKRDWVIPPISCENEGKGPFPK NLVQIKSNKDKEGKVFYSITQGADTPPVGVFIERETGWLKVTEPLDRERIATYTLFS HAVSSNGNAVEDPMEILITVTDQNDNKPEFTQEVFKGSMEGALPGTSVMEVTATD ADDDVNTYNAIAIAYTILSQDPELPDKNMFTINRNTGVSIVVTTGLDRESFPTYTLVVQ AADLQGEGLSTTATAVITVTDNDNPPIFNPTTYKGQVPENEANVVITLKVTDADAP NTPAWEAUVYILNDDGGQFVVTTNPVNDGILKTAKGLDFEAKQYILHVAVTNVV PFEVSLTTSTATVTVDLVDVNEAPIFVPPKRVSEDFGVGQEITSYTAQEPDTFME QKITYRIWRDTANWLEINPDTGAISTRAELDREDFEHVKNSTYTAJIATDNGSPVAT GTGTLILLSDVNDNAPIPEPRTIFFCERNPKPQVINIIDADLPPNTSPFTAELTHGASAN WTIQYNDPTQESILKPKMALEVGDYKINLKLMDNQNKDQVTTLEVSVCDEGAAG VCRKAQPVEAGLQIPAILGILGGILALLILLLLFLRRRAVVKPELLPPEDDTRDNVY YYDEEGGGEEDQDFDLSQLHRGLDARPEVTRNDVAPTLMSVPRYLPRPANPDEJGNF IDENLKAADTDPTAPPYDSLVLVFDYEGSGSEAAASLSSLNSESDDKDQDYDYLNEWGN RFKKLADMYGGGEDD</p>
42	CDH2 humana (N- cad.)	humano	aa	<p>MCRIAGALRTLPLLAALLQASVEASGEIALCKTGFPEDEVYSAVLSKDVHEGQPLLN VKFSNCNGKRKVQYESSEPADFKVDEDDGMVYAVRSFPLSSEHAKFLIYAQDKETQE KWQVAVKLSLKPTLTEESVKESAEEIVFPRQFSKSHGHLQKQKRDWVIPPINLPEN SRGPPQELVRIRSDRDKNLSLRYSVTGPADQPPPTGIFIINPISGQLSVTKPLDREQIAR FHLRAHAVDINGNQVENPIDIVINVIDMNDNRPEFLHQVWNGTVPEGSKPGTYVMTV TAIDADDPNALNGMLRYRIVSQAPSTSPNMFNTINNETGDIITVAAGLDREKVQQYTL IIQATDMEGNPTYGLSNTATAVITVTDVNDNPPPEFTAMTFYGEVPENRVDIIVANLTV</p>

				<p>TDKDPHTPAWNAVYRISGGDPTGREAQITDPNSNDGLVTVVKPIDFETNRMFVLTV AAENQVPLAKGIQHPQSTATVSVTVIDVNENPYFAPNPKIRQEEGLHAGTMLTTFT AQDPDRYMQQNIRYTKLSDPANWLKIDPVNGQITTI AVL DRESPNVKNNIYNATFLA SDNGIPMSGTGTQIYLLDINDNAPQVLPQEAETCETDPNSINITALDYDIDPNAGPF AFDLPLSPVTIKRNWTTIRLNGDF AQLNLKIKFLEAGIYEVPIITDSGNPPKSNISILRV KVCQCDSNGDCTDVDRIVGAGLGTGAILLCHILLVLVLMFVVMKRRDKERQAK QLLIDPEDDV RDNILKYDEEGGGEEDQDYDLSQLQQPDTVEPDAIKPVGIRRMDERPI HAEPQYPVRSAAAPHPGDIGDFINEGLKAADNDPTAPPYDSSLVFDYEGSGSTAGSLSS LNSSSSGGEQDYDYLNDWGPFRFKKLADMYGGGDD</p>
43	CDH4 humana (R- cad.)	humano	aa	<p>MTAGAGVLLLLLSL SGALRAHNEDLTRETCKAGFSEDDYTALISQNI LEKLLQV KFSSCVGTKGTQYETNSMDFKV GADGTVFATRELQVPSEQVAFVTAWDSQTAEK WDAVVRLLVAQTSSPHSGHKPKQKGVVALDPSPPKD TLLPWPQHQNANGLRRR KRDWVIPPINVPENSRGPFPQQLVRIRSDKNDIPRYSITGVGADQPPMEVFSIDSMS GRMYVTRPMDREEHASYHLRAHAVDMNGNKVENPIDLYIYVIDMNDNRPEFINQVY NGSVDEGSKPGTYVMVTANDADDSTTANGMVRYRIVTQTTPQSPSQNMFTINSETG DIVTVAAGLDREKVQYTVIVQATDMEGNLNYGLSNTATAIITVTDVNDNPPEFTAS TFAGEVPENRVETVVA NLTVMDRDQPHSPNWNAYRIISGDP SGHFSVRTDPVTNEG MVTVVKAVDYELNRAFMLTVMVSNQAPLASGIQMSFQSTAGVTISIMDINEAPYFPS NHKLIRLEEGVPPGTVLTTFSAVDPDRFMQQA VRYSKLSDPASWLHINATNGQITTA AVLDRESLYTKNNVYEATFLAADNGIPPASGTGTQIYILIDINDNAPELLPKEAQICEK PNLNAINITAADADVDPNIGPYVFEELPFVPA AVRKNWTTIRLNGDYAQLSLRILYLEA GMYDVPIIVTDSGNPPLSNTSIKVKVCPDDNGDCTTIGAVAAAGLGTGAIVAILJIL ILLTMVLLFVMWMKRREKERHTKQLLIDPEDDV RDNILKYDEEGGGEEDQDYDLSQ</p>

					LQQPEAMGHVPSKAPGVRRVDERVPVGAEPQYPIRPMVPHPGDIGDFINEGLRAADND PTAPPYDSL VFDYEGSGTAGSVSSLNSSSSGDDQDYDLNDWGPRFKKLADMYGG GEED
44	CDH5 humana (VE-cad)	humano	aa		MQRLMMLLATSGACGLLAAVAAAGANPAQRDTHSLPTHRRQRKRDWIWNQM HIDEKNTSLPHHV GKIKSSVSRKNAKYLKGEYVGKVRVDAETGDFAIERLDRE NISEYHLTAVIVDKDTGENLETPSSFITIKVHDVNDNWPVFTHRLFNASVPESAVGTS VISVTAVDADDPTVGDHASVMYQILKGKEYFAIDNSGRIITIKSLDREKQARYEIVV EARDAQGLRGDSGTATVLTQDINDNFPFTQTKYTFVVPEDTRVGTSGSLFVED PDEPQNRMTKYSILRGDYQDAFTIETNPAHNEGHIKPMKPLDYEYIQYSFIVEATDPT IDLRYMSPAGNRAQVIINITDVDEPPIFQQPFYHFQKLENQKKPLIGTVLAMDPDAAR HSIGYSIRRTSDKGQFFRVTKKGDYNEKELDREVVYPWYNLTVEAKELDSTGTPTGKE SIVQVHIEVLDEENDNAPEFAKPYQPKVCENAVHGGQLVLSAIDKDKITPRNVKFKFILN TENFTLTDNHDNTANITVKYGGFDREHTKVHFLPVVISDNGMPSRTGTSTLTVAVC KCNEQGEFTFCEDMAAQVGVSIQAVVAILLCILTITVITLLIFLRRRLRKQARAHGKSV PEIHEQLVTYDEEGGEMDTTSYDVSVLNSVRRGGAKPPRPALDARPSLYAQVQKPP RHAPGAHGGPGEMAAAMIEVKKDEADHDGDGPPYDTLHIYGYEGSESIAESLSSLGTD SSDSVDYDYLNDWGPRFKMLAELYGSDPREELLY
45	CDH1 de macaco	cynomol gus	aa		MGPWSRSLSALLLLQVSSWLCQEPCHPGFDAESYTFTVPRRHLEGRVLRVSVF EDCTGRQRTAYFSLDTRFKVGPDPGVITVKRPLQFHNPQHFLVYAWDSTYRKFKSTKV TLNTVGHHSRTPPLHASVSGVQAEELLTFPNSSPGLRRWKRDWVIPISPENEGKGPFP KNLVQIKSNKDKGKVYFYSITGGADTPPVGVFIERETGWLKVTEPLDRENIATYTL FSHAVSSNGNAVEDPMEILITVTDQNDNKPVFTQEVFKGSMEGALPGTSMVEVTAT

					DADDDVNTYNAAIAYSILSQDPELPDKNMFNTINKNTGVISVVTGLDRESFPMYTLV VQAADLQGEGLSTTATAVITVTDNDNPPVFNPTTYKGQVPENQANFVITTLKVTD DAPNTPAWEAVYTILNDNDGQFVVTNPNVTNDGILKTAAGLDFAKQYILHVAVT NVAPFEVSLTTSTATVTVDLVDVNEAPIFVPPEKRVSEDFGVQEITSYTAREPDTF MEQKITYRIWRDAANWLEINPDTGAISTRALDREDVEHVKNSTYTAJIATDNDHHL CDFLESHFLDEEVKLIKIAQESILKPKIALEVGDYKINLKLMDNQKKDQVTTLEVS CDCEGAAGICKKAPLVEAGMQIPAILGILGGILALLILLLLFLRRRAVVKEPLPPE DDTRDNVYYYDEEGGGEEDQDFDLSQLHRGLDARPEVTRNDVAPTLLSVPRYLPRP ANPDEIGNFIDENLKAADSDPTAPPYDSLLVFDYEGSGSEAASSLNSESSEDKDQDY DYLNEWGNRFFKKLADMYGGGEDD
46	CDH2 de macaco	cynomol gus	aa		MCRIAGALRTLPLLAALLQASVEASGEIALCKTGFPEDEVYSAVLSKDVHEGQPLN VKFSNCNGKRKVQYESSEPADFVDEDEGMVYAVRSFPLSSEHAKFLIYAQDKETQE KWQVAVKLSLKPALTEESVKEPEVEEIVFPRQLSKHSGHLQQRKRDWVIPPINLPEN SRGPPQELVRIRSDRDKNLSLRYSVTGPADQPPPTGIFIINPISGQLSVTKPLDREQIAR FHLRAHAVDINGNQVENPIDIVINVIDMNDNRPEFLHQVWNGTVPEGSKPGTYVMTV TAIDADDPNALNGMLRYRILSQAPSTSPNMFNTINNETGDIITVAAGLDREKVQQYTLI IQATDMEGNPTYGLSNTATAIITVTDVNDNPPEFTAMTFYGEVPENRVDVIVANLTVT DKDQPHTPAWNNAVYRISGGDPTGRFAIQDTPNSNDGLVTVVKPIDFETNRMFVLTVA AENQVPLAKGIQHPPQSTATVSVTVIDVNEPNPYFAPNPKIIRQEEGLHAGTMLTTFTA QDPDRYMQQNIRYTKLSDPANWLKIDPVNGQITTIATVLDRESPNVKNNIYNATFLAS DNGIPPMMSGTGLQIYLLDINDNAPQVLPQEAETCETPDPSINITALDYDIDPNAGPF AFDPLSPVTIKRNWTTIRLNGDFAQLNLKIKFLEAGIYEVPIIITDSGNPPKSNISILRV KVCQCDNSNGDCTDVDRIVGAGLGTGAIIAILLCIIILLLVLMFVVWMKRRDKERQAK

					<p>QLLIDPEDDVVRDNLKYDEEGGGEEDQYDLSQLQQPDTVEPDAIKPVGIRRMDERPI HAEPQYPVRSAAAPHPGDIGDFINEGLKAADNDPTAPPYDSLLVFDYEGSGSTAGSLSS LNSSSSGGEQDYDYLNDWGPFRFKKLADMYGGGDD</p>
47				<p>CDH4 de macaco</p> <p>cynomol gus</p> <p>aa</p>	<p>MTAGAGVLLLLLSGALRAHNEDLTTRETCKAGSEDDYTALISQNIKEGKLLQV KFSSCVGTGKTQYETNSVDFKVGSDGTVFATRELQVPSEQVFTVTAWDSQTAE DAVVRLLVAQTSSLHSGHKPQKGKKIVALDPSPPKDTLLPWPRHQNADGLRRKR DWVIPPINVPENSRGPPQQLVRIRSDKNDIPRYSITGVGADQPPMEVFSIDMSGR MYVTRPMDREEHASYHLRAHAVDMNGNKVENPIDLYIYVIDMNDNRPEFINQVYNG SVDEGSKPGEAFSFSRLSSPNTTAPGNGDSSHVVTRRPRGGQGLGTQTCAGDIVS LSRGMSEAKVQQYTVIVQATDMEGNLNYGLSNTATAIITVTDVNDNPPEFTASTFA GEVPENRVETVAVNLTVMDRDPQSPNWNNAVYRIISGDPSPGHFSVRTDPVTNEGMV TVVKAVDYELNRAFMLTMVSNQAPLASGIQMSFQSTAGVTISVMDINEAPYFSPNH KLIRLEEGVPPGTVLTTFSAVDPPDRFMQQAVRYSKLSDPANWLHINTTNGQITTA LDRESLYTKNNVYEATFLAADNGIPPASGTGLQIYLIDINDNAPELLPKEAQICEKPN LNAINITAADADVDPNIGPYVFELPFVPAAVRKNWTTITRLNGDYAQLSLRILYLEAGM YDVPIIVTDSGNPPLSNTSIIKVKVCPDDNGDCTTIGAVAAAGLGTGAIVAILCILLL TMVLLFVMWMKRREKERHTKQLLIDPEDDVVRDNLKYDEEGGGEEDQYDLSQLQ QPEAMGHVPSKAPGVRRVDERPVGAEPQYVVRPMVPHPGDIGDFINEGLRAADNDP TAPPYDSLLVFDYEGSGSTAGSVSSLNSSSSSGDQDYDYLNDWGPFRFKKLADMYGGG EED</p>
48				<p>CDH5 de macaco</p> <p>cynomol gus</p> <p>aa</p>	<p>MQRLMMLVATSGACLGLLAAAAAGANPAQRDTPSLLPTHRRQKRWDWVWVQ MHIDEKNTSLPHHVVGKIKSSSVSRKNAKYLKGEFVDKVFVRVDAETGDVFAIERLDR</p>

					ENISEYHLTAIVVDKDTGENLETPSSFTIKVHDVNDNWPVFTHRLFNASVPSSAVGT SVISVTAVDADDPTVGDHASVMYQILKGKEYFAIDNSGRIVTITKSLDREKQARYEIV VEARDAQGLRGDSGTATVLTLQDINDNFPFFQTQKTYTFVVPEDTRVGTSGSLFVE DPDEPQNRMTKYSILIRGDYQDAFTIETNPTNHEGILKPMKPLDYEYIQQYSEIVEATDP TIDRLYLSPAGNRAQVIINITDVDEPPIEQPFYHFQLKENQKKPLIGTVLAMDPDAA RHSIGYSIRRTSDKGQFFRVTKKGDYNEKELDREVYPWYNLTVEAKELDSTGTPTG KESIVQVHIEVLDENDNAPEFAQPYQPKVCENAAHGQLVLQISAIDKDIITPRNVKFKF TLNTENNFTLTDNHDNTANITVKYGGQFDREHTKVHELPVVISDNGMPSRTGTSTLTV AVCKCNEQGEFTCEDMAAQVGVSIQAVVAILLSILTITVIALLIFLRRRLRKQARAHG KSVPEIHEQLVITYDEEGGEMDTTSYDVSVLNSVRRGGAKPPRPALDARPSLYAQVQ KPPRHAPGAHGGPGEMAAAMIEVKKDEADHDGDGPPYDTLHIYGYEGSESIAESLSSL GTDSSDSDDVDFLNDWGPREFKMLAELYGSDPREELLY
49	D1B	CDH3-1	VH CDR1	aa	SYAMS
50			VH CDR2	aa	TISSGGHYTYYPDSVKG
51			VH CDR3	aa	YYYGIPFGY
52			VL CDR1	aa	RASQDIGINLI
53			VL	aa	DTSSLDS

			CDR2		
54			VL CDR3	aa	LQYGSSPLT
55			VH	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGHY TYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASYYGIPFGYWGGTL VTVSS
56			VL	aa	DIQMTQSPSTLSASLGDRVTTTCRASQDIGINLIWLQQKPKGKAPKRLIYDTSSLDGVP SRFSGSGGTEFTLTISSLQPDDEFATYYCLQYGSSPLTFGGGTKVEIK
57			scFv	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGHY TYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASYYGIPFGYWGGTL VTVSSGGGGGGGGGGGGGGDIQMTQSPSTLSASLGDRVTTTCRASQDIGINLIWLQQ KPGKAPKRLIYDTSSLDGVPSPRFSGSGGTEFTLTISSLQPDDEFATYYCLQYGSSPLTF GGGTKVEIK
58			molécula bipes- cífica	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGHY TYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASYYGIPFGYWGGTL VTVSSGGGGGGGGGGGGGGDIQMTQSPSTLSASLGDRVTTTCRASQDIGINLIWLQQ KPGKAPKRLIYDTSSLDGVPSPRFSGSGGTEFTLTISSLQPDDEFATYYCLQYGSSPLTF GGGTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYWGGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGTAVVTVQEPSTL VSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSL

						LGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGTKLTVL
59	D1B	CDH3-2	VH CDR1	aa		SYAMS
60			VH CDR2	aa		TISSGCHYTYYPDSVKG
61			VH CDR3	aa		YYYGIPFGY
62			VL CDR1	aa		RASQDIGINLI
63			VL CDR2	aa		DTSSLDS
64			VL CDR3	aa		LQYGSSPLT
65			VH	aa		EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLWVATISSGGH YTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASYYYGIPFGYWGGGT LVTVSS
66			VL	aa		DIQMTQSPSTLSASLGDRVTTTCRASQDIGINLIWLQOKPGKAPKRLIYDTSSLDSGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCLQYGSSPLTFGGGTKVEIK

67			scFv	aa	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGH YTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASYYYGIPFGYWGGGT LVTYSSGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSTLSASLGDRVTITCRASQDIGINLIWLQ QKPGKAPKRLIYDTSSLD SGVPSRFSGSGTEFTLTISSLQPDDEFATYYCLQYGSSPL TFGGGTKVEIK
68			molécula bipes- cífica	aa	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGH YTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASYYYGIPFGYWGGGT LVTYSSGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSTLSASLGDRVTITCRASQDIGINLIWLQ QKPGKAPKRLIYDTSSLD SGVPSRFSGSGTEFTLTISSLQPDDEFATYYCLQYGSSPL TFGGGTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYISYWAYWGGGT LVTYSSGGGGGGGGGGSGGSGTIVVTQEPSL TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGS LLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
69	D1B	CDH3-3	VH CDR1	aa	SYAMS
70			VH CDR2	aa	TISSGGHYTYYPDSVKG
71			VH CDR3	aa	YYYGIPFGY

72			VL CDR1	aa	RASQDIGINLI
73			VL CDR2	aa	DTSSLDS
74			VL CDR3	aa	LQYGSSPLT
75			VH	aa	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGH YTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASYYYGIPFGYWGQGT LVTVSS
76			VL	aa	DIQMTQSPSTLSASLGDRVITITCRASQDIGINLIWLQQKPGKAPKRLIYDTSSLD SGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPD D F A T Y Y C L Q Y G S S P L T F G G G T K V E I K
77			scFv	aa	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGH YTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASYYYGIPFGYWGQGT LVTVSSGGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSTLSASLGDRVITITCRASQDIGINLIWLQ QKPGKAPKRLIYDTSSLD SGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPD D F A T Y Y C L Q Y G S S P L TFGGGTKVEIK
78			molécula bipes- cífica	aa	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGH YTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASYYYGIPFGYWGQGT LVTVSSGGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSTLSASLGDRVITITCRASQDIGINLIWLQ QKPGKAPKRLIYDTSSLD SGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPD D F A T Y Y C L Q Y G S S P L

			e		TFGGGTVKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSQTIVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSG SLLGKKAALTLSGVQPEDEAEYVCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
79	DIB	CDH3-4	VH CDR1	aa	SSWMN
80			VH CDR2	aa	RIYPGDGETKYADSVKG
81			VH CDR3	aa	QRDYGALYAMDY
82			VL CDR1	aa	RVSDDIYSYA
83			VL CDR2	aa	NAKTLAE
84			VL CDR3	aa	QNHYYTPFT
85			VH	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSWMNWVRQAPGKGLEWVSRIYPGDG ETKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQRDYGALYAMDYW GQGLTVTVSS

86			VL	aa	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRVSDDIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGV PSRFSGSGGTEFTLTISLQPEDFATYYCQNHVYTPFTFGQGTKLEIK
87			scFv	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSWMNWVRQAPGKGLEWVSRIPGDG ETKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQRDYGALYAMDYW GQGTLVTVSSGGGGGGGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRVSDDIYSYL AWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGGTEFTLTISLQPEDFATYYCQNH YVTPFTFGQGTKLEIK
88			molécula biespe- cífica	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSWMNWVRQAPGKGLEWVSRIPGDG ETKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQRDYGALYAMDYW GQGTLVTVSSGGGGGGGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRVSDDIYSYL AWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGGTEFTLTISLQPEDFATYYCQNH YVTPFTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT EDTAVYYCVRHGFNGNSYISYWAYWGQGTLTIVSSGGGGGGGGGGSGGSGTQVVT QEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA RFGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
89	D1B	CDH3-5	VH CDR1	aa	TSWMN
90			VH CDR2	aa	RIYPGDGETKYNGKFKG

91				VH CDR3	aa	QRDYGALYALDY
92				VL CDR1	aa	RASENIYSYLA
93				VL CDR2	aa	NAKTLAE
94				VL CDR3	aa	QHHYVPPYT
95				VH	aa	EVQLVEQSGAELVKPGASVKISCKASGYAFSTSWMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPGD GETKYNKGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARQRDYGALYALDY WGQGTRVTVSS
96				VL	aa	ELMMTQTPASLSASVGETVTFTCRASENIYSYLA WYQQKQKSPQLLVYNKTLAE GVPSRFGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYVPPYTFFGGGKLEIK
97				scFv	aa	EVQLVEQSGAELVKPGASVKISCKASGYAFSTSWMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPGD GETKYNKGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARQRDYGALYALDY WGQGTRVTVSSGGGGGGGGGGSELMMTQTPASLSASVGETVTFTCRASENIY SYLA WYQQKQKSPQLLVYNKTLAEGVPSRFGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSY CQHHYVPPYTFFGGGKLEIK
98				molécula	aa	EVQLVEQSGAELVKPGASVKISCKASGYAFSTSWMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPGD GETKYNKGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARQRDYGALYALDY

						WQGTRVTVSSGGGGGGGGSELMMTQTPASLSASVGETVTVTTCRASENIY SYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGGTQFSLKINSLQPEDFGSYY CQHHYVPPYTFGGGKLEIKRTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWNVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGG GSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFK LAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHH HHHH
99	D1B	CDH3-6	VH CDR1	aa	SSWMN	
100			VH CDR2	aa	RIYPGDGETKYNKGKFKG	
101			VH CDR3	aa	QRDYGALYAMDY	
102			VL CDR1	aa	RASDDIYSYLA	
103			VL CDR2	aa	NAKTLAE	
104			VL CDR3	aa	QNHYYVTPFT	

105			VH	aa	EVQLVEESGPELVKPGASVKISKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPGD GETKYNKGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARQRDYGALYAMDY WGQGTSTVTVSS
106			VL	aa	ELVMTQSPASLSASVGETVTITCRASDDIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEG VPSRFGSGGTQFSLKINSLQPEDFGTYVCQNHYYVTPFTFGAGTKLEIK
107			scFv	aa	EVQLVEESGPELVKPGASVKISKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPGD GETKYNKGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARQRDYGALYAMDY WGQGTSTVTVSSGGGGGGGGGGSELVMTQSPASLSASVGETVTITCRASDDIYS YLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFGSGGTQFSLKINSLQPEDFGTYVC QNHYYVTPFTFGAGTKLEIK
108			molécule bivalente	aa	EVQLVEESGPELVKPGASVKISKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPGD GETKYNKGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARQRDYGALYAMDY WGQGTSTVTVSSGGGGGGGGGGSELVMTQSPASLSASVGETVTITCRASDDIYS YLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFGSGGTQFSLKINSLQPEDFGTYVC QNHYYVTPFTFGAGTKLEIKRTGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNK YAMNWVRQAPKGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGFNGNSYISYWAYWGQGTSTVTVSSGGGGGGGGGGGGGS QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLA PGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHH HH

109	D1B	CDH3-7	VH CDR1	aa	SSWMN	
110			VH CDR2	aa	RIYPGDGETKYNKFKG	
111			VH CDR3	aa	QRDYGALYAMDY	
112			VL CDR1	aa	RLENIYSYLA	
113			VL CDR2	aa	NSKTLAE	
114			VL CDR3	aa	QNHYGFPFT	
115			VH	aa	EVQLVEQSGAELVKPGASVKISKASGYAFSSWMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPCD GETKYNKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSTLTSEDSAVYFCARQRDYGALYAMDY WGQGTSTVTVSS	
116			VL	aa	ELQMTQSPASLSASVGETVTITCRLENIYSYLAWYRQKEGESPLL VYNSKTLAEGV PSRFSGSGGTQFSLKINSIQPEDFGNYCYCQNHYGFPFTFGAGTKLEIK	
117			soFv	aa	EVQLVEQSGAELVKPGASVKISKASGYAFSSWMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPCD GETKYNKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSTLTSEDSAVYFCARQRDYGALYAMDY WGQGTSTVTVSSGGGGGGGGGGSELOMTOSPASLSASVGETVTITCRLENIYS	

118					molécula biespe- cífica	aa	YLAWYRQKEGESPQLLVYNSKTLAEGVPSRFGSGGTQFSLKINSLOPEDFGNYCY QNHYGFPFTFGAGTKLEIK EVQVLEQSGAELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPGD GETKYNKGKFGKATLTADKSSSTAYMQLSTLTSEDNAVYFCARQRDYGALYAMDY WGGGTSVTVSSGGGGGGGGGGGSELQMTQSPASLSASVGETVTITCRLSENIYS YLAWYRQKEGESPQLLVYNSKTLAEGVPSRFGSGSGTQFSLKINSLOPEDFGNYCY QNHYGFPFTFGAGTKLEIKRTGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNK YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGGGGGS QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLA PGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHH HH
119	D1B	CDH3-8	VH	CDR1		aa	SYWMN
120			VH	CDR2		aa	HIYPGDDTNYNGKFKG
121			VH	CDR3		aa	DRGSFGAWFAY
122			VL	CDR1		aa	RASQDISNYLN

123			VL CDR2	aa	YTSRLHS
124			VL CDR3	aa	QQGNRNPPPT
125			VH	aa	EVQLVEQSGAEVVKPGASVKITCKASGYAFSSYWMNWVVRQRPKGKLEWIGHIYPGD GDTNNGKFKGKVTLTADKSSNTAYMQLSDLTPEDSAVYFCARDRGSFGAWFAYW GQGTTVTVSS
126			VL	aa	ELVMTQTPSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGV PSRFSGSGGTIDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNRNPPTFGGGKLEIK
127			scFv	aa	EVQLVEQSGAEVVKPGASVKITCKASGYAFSSYWMNWVVRQRPKGKLEWIGHIYPGD GDTNNGKFKGKVTLTADKSSNTAYMQLSDLTPEDSAVYFCARDRGSFGAWFAYW GQGTTVTVSSGGGGGGGGGGSELVMTQTPSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYL NWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGGTIDYSLTISNLEQEDIATYFCQQG NRNPPTFGGGKLEIK
128			molécula bipes- cífica	aa	EVQLVEQSGAEVVKPGASVKITCKASGYAFSSYWMNWVVRQRPKGKLEWIGHIYPGD GDTNNGKFKGKVTLTADKSSNTAYMQLSDLTPEDSAVYFCARDRGSFGAWFAYW GQGTTVTVSSGGGGGGGGGGSELVMTQTPSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYL NWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGGTIDYSLTISNLEQEDIATYFCQQG NRNPPTFGGGKLEIKRTSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPKGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGTLTVTSSGGGGGGGGGGSGQT

						VTQPSLTVSPGGIVTLTGSSTGAVTSGNYPNWNVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLGGAALTLGSGVQPEDEALYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
129	D1B	CDH3-9	VH CDR1	aa		TYGMS
130			VH CDR2	aa		TISSGGHYSYYPDSVKG
131			VH CDR3	aa		YYYGSPFAY
132			VL CDR1	aa		RASQDIGSSLN
133			VL CDR2	aa		DTSSLDS
134			VL CDR3	aa		VQYGSSPLT
135			VH	aa		EVQLVEESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFTSTYGMWSVVRQTPDKRLEWVATISSGG HYSYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCASYYYGSPFAYWGQG TTVTVSS
136			VL	aa		ELQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQKPDGTIKRLIYDTSSLDSGVP KRFSGSRSGDYSLTISSESEDFGDYYCVQYGSSPLTFGAGTKLEIK

137			scFv	aa	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFTSTYGMWVVRQTPDKRLEWVATISSGG HYSYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCASYYYGSPFAYWGQG TTVTVSSGGGGSGGGGGGSELMQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNW LQKQPDGTIKRLIYDTSSLD SGVPKRFSGRSRSGDYSLTISSLESEDFGDYYCVQYGSS PLTFGAGTKLEIK
138			molécula biespe- cífica	aa	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFTSTYGMWVVRQTPDKRLEWVATISSGG HYSYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCASYYYGSPFAYWGQG TTVTVSSGGGGSGGGGGGSELMQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNW LQKQPDGTIKRLIYDTSSLD SGVPKRFSGRSRSGDYSLTISSLESEDFGDYYCVQYGSS PLTFGAGTKLEIKRTSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT EDTAVYYCVRHGNGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGGGSGTSTVVT QEPSLTVSPGGTIVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA RFGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
139	DIB	CDH3-10	VH CDR1	aa	SYAMS
140			VH CDR2	aa	TISSGGHYTYYPDSVKG
141			VH CDR3	aa	YYYGIPFGY

142			VL CDR1	aa	RASQDIGINLI
143			VL CDR2	aa	DTSSLDS
144			VL CDR3	aa	LQYGSSPLT
145			VH	aa	EVQLVEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGH YTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCASYYYGIPFGYWGQGT TVTVSS
146			VL	aa	ELVMTQSPSSLSASLGEVSLTCRASQDIGINLIWLRQEPDGTIKRLIYDTSSLDGVPK RFGSRSGSDYSLTSSLESEDFVHYCYCLQYGSSPLTFGAGTKLEIK
147			scFv	aa	EVQLVEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGH YTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCASYYYGIPFGYWGQGT TVTVSSGGGGGGGGGGSELVMTQSPSSLSASLGEVSLTCRASQDIGINLIWLR QEPDGTIKRLIYDTSSLDGVPKRFSGSRSGSDYSLTSSLESEDFVHYCYCLQYGSSPLT FGAGTKLEIK
148			molécula bipespe- cífica	aa	EVQLVEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGH YTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCASYYYGIPFGYWGQGT TVTVSSGGGGGGGGGGSELVMTQSPSSLSASLGEVSLTCRASQDIGINLIWLR QEPDGTIKRLIYDTSSLDGVPKRFSGSRSGSDYSLTSSLESEDFVHYCYCLQYGSSPLT

					FGAGTKLEIKRTSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGGGGGSGTQVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSG SLLGKKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHH
149	D2C	CDH3-11	VH CDR1	aa	SYPIN
150			VH CDR2	aa	VIWTGGGTNYASSVKG
151			VH CDR3	aa	SRGVYDFDGRGAMDY
152			VL CDR1	aa	KSSQSLLYSSNQKNYLA
153			VL CDR2	aa	WASTRES
154			VL CDR3	aa	QQYYSYPYT
155			VH	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYPINWVRQAPGKLEWVSVIWTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGLVTVSS

156			VL	aa	DIVMTQSPDSLAVSVGERVTINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA STRESGVPDRFSGSGGTDFLTITISLQAEDVAVYYCQYYSYPTFGQGTKLEIK
157			scFv	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLSSYPINWVRQAPGKGLWVSVIWTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLVTVSSGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSVGERVTINCKSSQSLLY SSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA STRESGVPDRFSGSGGTDFLTITISLQAEDV AVYYCQYYSYPTFGQGTKLEIK
158			molecule specific	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLSSYPINWVRQAPGKGLWVSVIWTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLVTVSSGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSVGERVTINCKSSQSLLY SSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA STRESGVPDRFSGSGGTDFLTITISLQAEDV AVYYCQYYSYPTFGQGTKLEIK KSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWWVRQAPGKGLWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGSG GGGSGTIVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
159	D2C	CDH3-12	VH CDR1	aa	SYPIN
160			VH CDR2	aa	VIWTGGGTNYNPSLKS

161			VH CDR3	aa	SRGVYDFDGRGAMDY
162			VL CDR1	aa	KSSQSLLYSSNQKNYLA
163			VL CDR2	aa	WASTRES
164			VL CDR3	aa	QQYYSYPYT
165			VH	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSITSYPINWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGGTN YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCARSRGVYDFDGRGAMDYWG QGTLVTVSS
166			VL	aa	DIVMTQSPASLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLA STRESGVPDFRFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSYPYTFGGGTKLEIK
167			scFv	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSITSYPINWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGGTN YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCARSRGVYDFDGRGAMDYWG QGTLVTVSSGGGGGGGGGGSDIVMTQSPASLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSN QKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQYYSYPYTFGGGTKLEIK
168			molécula	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSITSYPINWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGGTN YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCARSRGVYDFDGRGAMDYWG

						QGTLVTVSSGGGGGGGGSDIVMTQSPASLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSN QKNYLAWYQQKPGQPKLLIYWASTRESGVPDFRFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSYPYTFGQGTKEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLLVTVSSGGGGGGGGGG GSQTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNVVQQKPGQAPRGLIGGTFK LAPGTPARFSGSLGGKAALTLGVPQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
169	D2C	CDH3-13	VH CDR1	aa	SYPIN	
170			VH CDR2	aa	VIWTGGGTNYASSVKG	
171			VH CDR3	aa	SRGVYDFDGRGAMDY	
172			VL CDR1	aa	KSSQSLLYSSNQKNYFA	
173			VL CDR2	aa	WASTRES	
174			VL CDR3	aa	QQYYSYPYT	
175			VH	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQAPGKGLEWVGVIWTGGGT	

					NYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGLVTVSS
176		VL	aa		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYFAWYQQKPPKLLIYWA STRESGVPDFRFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSYPYTFGQGTKLEIK
177		scFv	aa		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQAPGKGLEWVGIWVGSGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGLVTVSSGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLY SSNQKNYFAWYQQKPPKLLIYWASTRESGVPDFRFGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQYYSYPYTFGQGTKLEIK
178		molécula bipes- cífica	aa		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQAPGKGLEWVGIWVGSGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGLVTVSSGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLY SSNQKNYFAWYQQKPPKLLIYWASTRESGVPDFRFGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQYYSYPYTFGQGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNTAYYADS VKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGGGGGSG GGGQTVVVTQEPSTVSPGGTVLTTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
179	D2C	CDH3-14	VH CDR1	aa	SYPIN

180			VH CDR2	aa	VIWTTGGGTNNPSLKS
181			VH CDR3	aa	SRGVYDFDGRGAMDY
182			VL CDR1	aa	KSSQSLLYSSNQKNYLA
183			VL CDR2	aa	WASTRES
184			VL CDR3	aa	QQYYSYPYT
185			VH	aa	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSITSYPINWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGGTN YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCARSRGVYDFDGRGAMDYWG QGTLVTVSS
186			VL	aa	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWA STRESGVPDFRFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIK
187			scFv	aa	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSITSYPINWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGGTN YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCARSRGVYDFDGRGAMDYWG QGTLVTVSSGGSGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSN QKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDFRFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV

					YYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIK	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSITSYPINWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGGTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTA VYVCARSRGVYDFDGRGAMDYWG QGTLVTVSSGGGGGGGGSDIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLYSSN QKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPRFSGSGGTDFLTITISLQAEDVAV YYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTA VYVCVRHGFNSYVSWWAYWQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGG GSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFK LAPGTPARFSGSLGGKAAALTLSGVQPEDEAEYVCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
188					aa	
					molécula bipes- cífica	
189	D2C	CDH3-15	VH CDR1	aa	SYPIN	
190			VH CDR2	aa	VIWTGGGTNYASSVKG	
191			VH CDR3	aa	SRGVYDFDGRGAMDY	
192			VL CDR1	aa	KSSQSLYSSNQKNYLA	
193			VL CDR2	aa	WASTRES	

194			VL CDR3	aa	QQYYSYPYT
195			VH	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYPINWVRQAPGKGLEWVSVIWTGGGT NYASSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLVTVSS
196			VL	aa	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQP KLLIYWA STRESGVPPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIK
197			scFv	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYPINWVRQAPGKGLEWVSVIWTGGGT NYASSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLY SSNQKNYLAWYQQKPGQP KLLIYWASTRESGVPPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAED VAVYYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIK
198			molécula bipes- cífica	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYPINWVRQAPGKGLEWVSVIWTGGGT NYASSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLY SSNQKNYLAWYQQKPGQP KLLIYWASTRESGVPPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAED VAVYYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTENKYAMNWNVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGGG SGGGGSQT VVTQEP SLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNWNVQQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLT

					VL	
199	D2C	CDH3-16	VH CDR1	aa	SYTN	
200			VH CDR2	aa	VIWTGGGTNNPSSLKS	
201			VH CDR3	aa	SRGVYDFDGRGAMDY	
202			VL CDR1	aa	KSSQSLLYSSNQKNYLA	
203			VL CDR2	aa	WASTRES	
204			VL CDR3	aa	QQYYSYPT	
205			VH	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSITSYPINWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGGTN YNPSLKSRTISVDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARSRGVYDFDGRGAMDYWG QGTLVTVSS	
206			VL	aa	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC KSSQSLLYSSNQKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYW A STRESGVPDFRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPTTFGGGTGLEIK	

207			scFv	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETSLTCTVSGGSITSYPINWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGGTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCARSRGVYDFDGRGAMDYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSN QKNYLAWYQQKPGQPKLLIYWASTRESGVPDFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIK
208			molécula bipes- cífica	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETSLTCTVSGGSITSYPINWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGGTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCARSRGVYDFDGRGAMDYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSN QKNYLAWYQQKPGQPKLLIYWASTRESGVPDFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTA VYYCVRHGNFNSYVSWWAYWQGTLVTVSSGGGGSGGGGGG GSQTVVTVQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTFK LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
209	D2C	CDH3-17	VH CDR1	aa	SYPIN
210			VH CDR2	aa	VIWTGGGTNYASSVKG
211			VH CDR3	aa	SRGVYDFDGRGAMDY

212			VL CDR1	aa	KSSQSLLYSSNQKNYLA
213			VL CDR2	aa	WASTRES
214			VL CDR3	aa	QQYYSYPYT
215			VH	aa	EVQLLESGGGLVPPGGLRLSCAVSGFTFSYPINWVRQAPGKGLEWVGVIWVGTTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLLVTVSS
216			VL	aa	DIVMTQSPDSLAVSVGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA STRESGVDPDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIK
217			scFv	aa	EVQLLESGGGLVPPGGLRLSCAVSGFTFSYPINWVRQAPGKGLEWVGVIWVGTTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLLVTVSSGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSVGERATINCKSSQSLLY SSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIK
218			molécula bipes- cífica	aa	EVQLLESGGGLVPPGGLRLSCAVSGFTFSYPINWVRQAPGKGLEWVGVIWVGTTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLLVTVSSGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSVGERATINCKSSQSLLY SSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDV

					AVYYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGSG GGGQTVVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
219	D2C	CDH3-18	VH CDR1	aa	SYPIN
220			VH CDR2	aa	VIWTGGGTNYASSVKG
221			VH CDR3	aa	SRGAYDFDGRGAMDY
222			VL CDR1	aa	KSSQSLLYSSNQKNYLA
223			VL CDR2	aa	WASTRES
224			VL CDR3	aa	QQYYSYPYT
225			VH	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYPINWVRQAPGKGLEWVGVIWTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGAYDFDGRGAMDY WGQGLTVTVSS

226			VL	aa	DIVMTQSPDSLAVSLGEKATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGGTDTFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGQGTKLEIK
227			scFv	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYPINWVRQAPGKGLVWVGVIWTGGGTNYASSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGAYDFDGRGAMDYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGEKATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGGTDTFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGQGTKLEIK
228			mólcula biespe- cífica	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYPINWVRQAPGKGLVWVGVIWTGGGTNYASSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGAYDFDGRGAMDYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGEKATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGGTDTFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGQGTKLEIKSVLVESSGGGLVQPGGSLKLSCAAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLVWVRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGSGGGSGTIVVTQEPSLTVSPGGTIVLTTCSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
229	D2C	CDH3-19	VH CDR1	aa	SYPIN
230			VH CDR2	aa	VIWTGGGTNYASSVKG

231			VH CDR3	aa	SRGVYDFDGRGAMDY
232			VL CDR1	aa	KSSQSLLYSSNQKNYLA
233			VL CDR2	aa	WASTRES
234			VL CDR3	aa	QQYYSYPYT
235			VH	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQAPGKGLEWLSVIWTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGLTVTVSS
236			VL	aa	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPKLLIYWA STRESGVDPDRFSGSGGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGQGTKLEIK
237			scFv	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQAPGKGLEWLSVIWTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGLTVTVSSGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLY SSNQKNYLAWYQQKPGQPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGGTDFTLTISSVQAED VAVYYCQQYYSYPYTFGGQGTKLEIK
238			molécula	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQAPGKGLEWLSVIWTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY

					WGQGTLLVTSSGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLY SSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRSGSGGTDFTLTISSVQAED VAVYYCQQYYSPYTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGFNGNSYISYWAYWGQGTLLVTSSGGGGGGGGG SGGGGSQTIVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VL
239	D2C	CDH3-20	VH CDR1	aa	SYPIN
240			VH CDR2	aa	VIWTGGGTNYADSVKG
241			VH CDR3	aa	RGVYDFDGRGAMDY
242			VL CDR1	aa	KSSQSLLYSSNQKNYLA
243			VL CDR2	aa	WASTRES
244			VL CDR3	aa	QQYYSPYPT

245			VH	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYPINWVRQAPGKGLEWVSIVIWTGGGT NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLVTVSS
246			VL	aa	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPKLLIYWA STRESGVPRDFSGSGGTDTFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGTKEIK
247			scFv	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYPINWVRQAPGKGLEWVSIVIWTGGGT NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLY SSNQKNYLAWYQQKPGQPKLLIYWA STRESGVPRDFSGSGGTDTFTLTISLQAEDV AVYYCQQYYSYPYTFGQGTKEIK
248			molécula bipes- cífica	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYPINWVRQAPGKGLEWVSIVIWTGGGT NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLY SSNQKNYLAWYQQKPGQPKLLIYWA STRESGVPRDFSGSGGTDTFTLTISLQAEDV AVYYCQQYYSYPYTFGQGTKEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGSG GGGQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
249	D2C	CDH3-21	VH CDR1	aa	SYPIN

250			VH CDR2	aa	VIWTGGGTNYNSALKS
251			VH CDR3	aa	SRGVYDFDGRGAMDY
252			VL CDR1	aa	KSSQSLLYSSNQKNYLA
253			VL CDR2	aa	WASTRES
254			VL CDR3	aa	QQYYSYPT
255			VH	aa	EVQLLEESGPGLVTPSQSLSTCTVSGFSLTSYPINWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGGT NYNSALKSRLSITKDNKSQVFLKMTSLQTDTDARYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTTVTVSS
256			VL	aa	ELVMTQSPSSLAIVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW ASTRESGVPRDFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPTFGGGTKLEIK
257			scFv	aa	EVQLLEESGPGLVTPSQSLSTCTVSGFSLTSYPINWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGGT NYNSALKSRLSITKDNKSQVFLKMTSLQTDTDARYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGGSELVMTQSPSSLAIVSVGEKVTMSCKSSQSL YSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPRDFTGSGSGTDFTLTISSVKAE

					DLAVYYCQQYYSYPYTFGGGTKLEIK
258				molécula bipes- cífica	aa
					EVQLLEESGPGLVTPSQSLSTCTVSGFSLTSYPINWVRQPPGKGLEWLVIVTGGGT NYSALKSRLSITKDNKSQVFLKMTSLQTDLTARYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTITVTVSSGGGGGGGGGGSELVMTQSPSSLAIVSVGEKVTMSCKSSQSL YSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFLTISSVKAE DLAVYYCQQYYSYPYTFGGGTKLEIKRTSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS AASGFTFNKYAMNWWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDAVYYCVRHGFNGNSYISYWAYWGQGTITVTVSSGGGGSG GGSGGGGSGTQVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVLHHHHHH
259	D2C	CDH3-22	VH CDR1	aa	SYPIN
260			VH CDR2	aa	VIWTGGGTNYNSALKS
261			VH CDR3	aa	SRGVYDFDGRGAMDY
262			VL CDR1	aa	KSSQSLYSSNQKNYLA
263			VL	aa	WASTRES

			CDR2			
264			VL CDR3	aa	QQYYSYPY	
265			VH	aa	EVQLLEESGPGLVAPSQLSITCTVSGFSLTSYPINWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGGT NYSALKSRSLITKDNKSQVFLKMTSLQTDITARYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTITVTVSS	
266			VL	aa	ELVMTQSPSSLAIVSVEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW ASTRESGVDRFTGSGGTDFTLTISIVKAEDLAVYYCQQYYSYPYTFGGGTKEIK	
267			scFv	aa	EVQLLEESGPGLVAPSQLSITCTVSGFSLTSYPINWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGGT NYSALKSRSLITKDNKSQVFLKMTSLQTDITARYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTITVTVSSGGGGGGGGGGGGSELVMTQSPSSLAIVSVEKVTMSCKSSQSL LYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDRFTGSGGTDFTLTISIVKAE DLAVYYCQQYYSYPYTFGGGTKEIK	
268			mólcúla biespe- cífica	aa	EVQLLEESGPGLVAPSQLSITCTVSGFSLTSYPINWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGGT NYSALKSRSLITKDNKSQVFLKMTSLQTDITARYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTITVTVSSGGGGGGGGGGGGSELVMTQSPSSLAIVSVEKVTMSCKSSQSL LYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDRFTGSGGTDFTLTISIVKAE DLAVYYCQQYYSYPYTFGGGTKEIKRTSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYAWYWGQGTITVTVSSGGGGGG GGGGGGGGSQTVVTEPSLTVSPGGTVTLTSGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR	

						GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLSCVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVLHHHHHH
269	D2C	CDH3-23	VH CDR1	aa		SYPIN
270			VH CDR2	aa		VIWTGGGTNYDSALKS
271			VH CDR3	aa		SRGAYDFDGRGAMDY
272			VL CDR1	aa		KSSQSLLYSSNQKNYLA
273			VL CDR2	aa		WASTRES
274			VL CDR3	aa		QQYYSPYT
275			VH	aa		EVQLVEESGPGGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTSYPINWVRQPPGKLEWLGVIWTGGGT NYDSALKSRLTISKDNSKQVFLKMNSLQTDGTAIRYCARSRGAYDFDGRGAMDY WGQGTITVTVSS
276			VL	aa		ELVMTQSPSSLAIVSVEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW ASTRESGVDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSPYTFGGGKLEK

277			scFv	aa	EVQLVEESGPGLVAPQSLSITCTVSGFSLTSYPINWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGGT NYDSALKSRILTISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETARYYCARSRGAYDFDGRGAMDY WGQGTITVTVSSGGGGGGGGGGGGSELVMTQSPSSLAIVSVGEKVTMSCKSSQSL YSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISSVKAE DLAVYYCQQYYSPYTFGGGKLEIK
278			molécula bipes- cífica	aa	EVQLVEESGPGLVAPQSLSITCTVSGFSLTSYPINWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGGT NYDSALKSRILTISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETARYYCARSRGAYDFDGRGAMDY WGQGTITVTVSSGGGGGGGGGGGGSELVMTQSPSSLAIVSVGEKVTMSCKSSQSL YSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISSVKAE DLAVYYCQQYYSPYTFGGGKLEIKRTSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS AASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGFNGNSYISYWAYWGQGTITVTVSSGGGGSG GGSGGGGSGTQVTVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGCKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVLHHHHHH
279	D3A	CDH3-24	VH CDR1	aa	SYWMH
280			VH CDR2	aa	VDTSDSYTIYNQKFQG
281			VH CDR3	aa	SGPGYFDV

282			VL CDR1	aa	RASGNIHNYLA
283			VL CDR2	aa	NAKTLAD
284			VL CDR3	aa	QHFWSTPYT
285			VH	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTIYNQKFQGRVTMTTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS ¹ GPYFDVWGQG TMVTVSS
286			VL	aa	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTTITCRASGNIHNYLAWYQQKPGKAPKLLIYN ² AKTLADG VPSRFSGSGSGTEFTLKISSLQPEDFATYYCQHF ³ WSTPYTFGGQGTKLEIK
287			scFv	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTIYNQKFQGRVTMTTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS ¹ GPYFDVWGQG TMVTVSSGGGGGGGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTTITCRASGNIHNYLAW YQQKPGKAPKLLIYN ² AKTLADGVPSRFSGSGSGTEFTLKISSLQPEDFATYYCQHFWS TPYTFGGQGTKLEIK
288			molécula bipes- cífica	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTIYNQKFQGRVTMTTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS ¹ GPYFDVWGQG TMVTVSSGGGGGGGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTTITCRASGNIHNYLAW YQQKPGKAPKLLIYN ² AKTLADGVPSRFSGSGSGTEFTLKISSLQPEDFATYYCQHFWS

					TPYTFGQGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGGGSGTQTVVTQE PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFS GSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYVCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
289	D3A	CDH3-25	VH CDR1	aa	SYWMH
290			VH CDR2	aa	VIDTSDSYTIYNQKFKG
291			VH CDR3	aa	SGPGYFDV
292			VL CDR1	aa	RASENIYSYLA
293			VL CDR2	aa	NAKTLAE
294			VL CDR3	aa	QHGYGTPYT
295			VH	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYWMHWVVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTIYNQKFKGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARSGPGYFDVWGQG TMVTVSS

296			VL	aa	DIQLTQSPFLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPKAPKLLIYNAKTLAEGV PSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPYTFGGQTKLEIK
297			scFv	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTIYNQKFKGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDAVYYCARSGPGYFDVWGQG TMVTVSSGGGGSGGGGGGSDIQLTQSPFLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAW YQKPKGAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYG TPYTFGGQTKLEIK
298			molécula bipes- cífica	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTIYNQKFKGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDAVYYCARSGPGYFDVWGQG TMVTVSSGGGGSGGGGGGSDIQLTQSPFLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAW YQKPKGAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYG TPYTFGGQTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGSGTIVTQE PSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFS GSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
299	D3A	CDH3-26	VH CDR1	aa	SYWMH
300			VH CDR2	aa	VIDTSDSYTIYNQKFGQ

301			VH CDR3	aa	SGPGYFDV
302			VL CDR1	aa	RASENIYSYLA
303			VL CDR2	aa	NAKTLAE
304			VL CDR3	aa	QHHYGTPYT
305			VH	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTYNQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARS GPGYFDVWGQG TMVTVSS
306			VL	aa	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASENIYSYLA WYQQKPKGAPKLLVYN AKTLAEG VPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPYTFGQGTKLEIK
307			scFv	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTYNQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARS GPGYFDVWGQG TMVTVSSGGGGSGGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASENIYSYLA W YQQKPKGAPKLLVYN AKTLAEGVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHHY GTPYTFGQGTKLEIK
308			molécula	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTYNQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARS GPGYFDVWGQG

					TMVTVSSGGGGGGGGGGGGGGDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASENIYSYLA YQKPGKAPKLLVYNAKTLAEGVPSRFSGGSGTEFTLTIISSLPEDFATYYCQHHY GTPYTFGQGTKEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTED TAVYYCVRHGNFNSYVSWWAYWGQGTLLTVSSGGGGGGGGGGGGGSGQTVVTQ EPLSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPAR FSGLLGKGKAAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
309	D3A	CDH3-27	VH CDR1	aa	SYWMH
310			VH CDR2	aa	VIDTSDSYTYAQKFQG
311			VH CDR3	aa	SGPGYFDV
312			VL CDR1	aa	RASENIYSYLA
313			VL CDR2	aa	NAKTLAE
314			VL CDR3	aa	QHHYGTPYT
315			VH	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDTS

					DSYTIYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCARSGPGYFDVWVGQ TMVTVSS
316		VL	aa		DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGV PSRFSGSGGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPYTFGQGTKLEIK
317		scFv	aa		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTIYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCARSGPGYFDVWVGQ TMVTVSSGGGGGGGGGGDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAW YQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYG TPYTFGQGTKLEIK
318		molécula bipes- cífica	aa		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTIYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCARSGPGYFDVWVGQ TMVTVSSGGGGGGGGGGDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAW YQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYG TPYTFGQGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSCAASGFTFNSYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWWAWWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGSGGSGTIVTQE PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFS GSLGGKAAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
319	D3A	CDH3-28	VH CDR1	aa	SYWMH

320			VH CDR2	aa	VIDTSDSYTIYNQKVKG
321			VH CDR3	aa	SGPGYFDV
322			VL CDR1	aa	RASGNIHNYLA
323			VL CDR2	aa	NAKTLAD
324			VL CDR3	aa	QHSWSTPYT
325			VH	aa	EVQLLESGGGLVPRPGSLRLSCAASGYTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWIGVIDTSDS YTIYNQKVKGRTISRDNKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARSGPGYFDVWGQGT MVTVSS
326			VL	aa	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTTTCRASGNIHNYLAWYQQKQKAPKLLINYNAKTLADG VPSRFSGGSGTEFTLTISSLQPEDEFATYYCQHSWSTPYTFGGGTGLEIK
327			scFv	aa	EVQLLESGGGLVPRPGSLRLSCAASGYTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWIGVIDTSDS YTIYNQKVKGRTISRDNKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARSGPGYFDVWGQGT MVTVSSGGGGGGGGGGGGDIQLTQSPSFLSASVGDRVTTTCRASGNIHNYLAWY QQKQKAPKLLINYNAKTLADGVPSRFSGGSGTEFTLTISSLQPEDEFATYYCQHSWST

						PYTFGQGTKLEIK	
328					molécula bipes- cífica	aa	EVQLLESGGGLVPRPGGSLRLSCAASGYTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWIGVIDTSDS YTIYNQKVKGRTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGPGYFDVWGQGT MVTVSSGGGGSGGGGGGSDIQLTQSPFSLASVGDRTITCRASGNIHNYLAWY QQKQKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHSWST PYTFGQGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT AVYYCVRHGNGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGGGSGTQVTVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFS GSLGKGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
329	D3A	CDH3-29	VH CDR1	aa		SYWMH	
330			VH CDR2	aa		VIDTSDSYTIYNQKVKG	
331			VH CDR3	aa		SGPGYFDV	
332			VL CDR1	aa		RASGNIHNYLA	
333			VL CDR2	aa		NAKTLAD	

334			VL CDR3	aa	QHSWSTPYT
335			VH	aa	EVQLLESGGGLVPRPGSLRLSCAASGYTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWIGVIDTSDS YTIYNQKVKGRTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGPGYFDVWGQGT MVTVSS
336			VL	aa	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTTTCRASGNIHNYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLADG VPSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHSWSTPYTFGQGTKLEIK
337			scFv	aa	EVQLLESGGGLVPRPGSLRLSCAASGYTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWIGVIDTSDS YTIYNQKVKGRTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGPGYFDVWGQGT MVTVSSGGGGGGGGGGGGDIQLTQSPSFLSASVGDRVTTTCRASGNIHNYLAWY QQKPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHSWST PYTFGQGTKLEIK
338			molécula biespe- cífica	aa	EVQLLESGGGLVPRPGSLRLSCAASGYTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWIGVIDTSDS YTIYNQKVKGRTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGPGYFDVWGQGT MVTVSSGGGGGGGGGGGGDIQLTQSPSFLSASVGDRVTTTCRASGNIHNYLAWY QQKPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHSWST PYTFGQGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT AVYYCVRHGNGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGSGTQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFS GSLLGKKAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL

339	D3A	CDH3-30	VH CDR1	aa	SYWMH
340			VH CDR2	aa	VIDTSDSYTIYNQKVKG
341			VH CDR3	aa	SGPGYFDV
342			VL CDR1	aa	RASENIYSYLA
343			VL CDR2	aa	NAKTLAE
344			VL CDR3	aa	QHHYGTPTYT
345			VH	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWMHVVRRQAPGKGLWMSGVIDTSD SYTIYNQKVKGRTISRDNKNTVYVLMNSLRAGDTAVYYCARSQPGYFDVWGQGT MVTVSS
346			VL	aa	DIQLTQSPSFLSASVGDRTTTCRASENIYSYLAWYQQKPKAPKLLIYNAKTLAEGV PSRFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFGTYTCQHHYGTPTYTFGQGTKEIK
347			scFv	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWMHVVRRQAPGKGLWMSGVIDTSD SYTIYNQKVKGRTISRDNKNTVYVLMNSLRAGDTAVYYCARSQPGYFDVWGQGT MVTVSSGGGGGGGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRTTTCRASENIYSYLAWY

					QQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFGTYCQHHYGT PYTFGQGTKLEIK
348				molécula bienespe- cífica	aa EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWMGVDTSD SYTIYNQVKVGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAGDTAVVYCARS GPYFDVWGQGT MVTSSGGGGGGGGGGSDIQLTQSPFLSAVGDRTTTCRASENIYSYLAWY QQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFGTYCQHHYGT PYTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT AVYYCVRHGFNGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGSGGSGTQVTVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFS GSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
349	D3A	CDH3-31	VH CDR1	aa	SYWMH
350			VH CDR2	aa	VIDTSDSYTIYNQKVKG
351			VH CDR3	aa	SGPGYFDV
352			VL CDR1	aa	RASENIYSYLA
353			VL	aa	NAKTLAE

			CDR2			
354			VL CDR3	aa	QHHYGTPYT	
355			VH	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWVGVIDTSDS YTIYNQKVKGRTISRDTSKNTVYLQNSLRAEDTAVYYCAKSGPGYFDVWVGQGT MTVSS	
356			VL	aa	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGV PSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFASYCQHHYGTPTFTGGQTKLEIK	
357			scFv	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWVGVIDTSDS YTIYNQKVKGRTISRDTSKNTVYLQNSLRAEDTAVYYCAKSGPGYFDVWVGQGT MTVSSGGGGGGGGGGGGDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQ KPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFASYCQHHYGTPT FTGGQTKLEIK	
358			molécula bipes- cífica	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWVGVIDTSDS YTIYNQKVKGRTISRDTSKNTVYLQNSLRAEDTAVYYCAKSGPGYFDVWVGQGT MTVSSGGGGGGGGGGGGDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQ KPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFASYCQHHYGTPT FTGGQTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNGNSYISYWAYWGQGTLTVTSSGGGGGGGGGGGSGTQVVTQEPSLT VSPGGTIVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSL	

						LGKKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGTKLTVL
359	D3A	CDH3-32	VH CDR1	aa		SYWMH
360			VH CDR2	aa		VIDTSDSYTIYNQKFKG
361			VH CDR3	aa		SGPGYFDV
362			VL CDR1	aa		RASENIYSYLA
363			VL CDR2	aa		NAKTLAE
364			VL CDR3	aa		QHHYGTPYT
365			VH	aa		EVQLVEQPGAEELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDTSD SYTIYNQKFKGKATLTVDITSSSTAYMQLSSLTSEDSSVYFCARSGPGYFDVWGQGTT VTVSS
366			VL	aa		ELQMTQSPASLSASVGETVITTCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNNAKTLAEG VPSRFSGSGGTQFSLKINSIQPEDFGSYQCQHHYGTPYTFGGGTKLEIK

367			scFv	aa	EVQLVEQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDTSD SYTIYNQKFKGKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSSVYFCARSGPGYFDVWVGQGT VTVSSGGGGGGGGSELQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQ QKQKSPQLLVYNAKTAEGLPSRFGSGSGTGTFSLKINSLQPEDFGSYYCQHLYGT PYTFGGGTKLEIK
368			molécula bienespe- cífica	aa	EVQLVEQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDTSD SYTIYNQKFKGKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSSVYFCARSGPGYFDVWVGQGT VTVSSGGGGGGGGSELQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQ QKQKSPQLLVYNAKTAEGLPSRFGSGSGTGTFSLKINSLQPEDFGSYYCQHLYGT PYTFGGGTKLEIKRTSGGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK EDTA VYYCVRHGNFGNSIYWYWGQGLVTVS SGGGGSGGGSGGSQT VVT QEPLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQA PRGLIGTKFLAPGTPA RFSGLLGGKAAL T LSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFSGG GTKL TLVHHHHH
369	D3A	CDH3-33	VH CDR1	aa	SYWMH
370			VH CDR2	aa	VIDTSDSYTIYNQKFKG
371			VH CDR3	aa	SGPGYFDV

372			VL CDR1	aa	RASGNIHNYLA
373			VL CDR2	aa	NAKTLAD
374			VL CDR3	aa	QHFWSPTYT
375			VH	aa	EVQLVEQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQGLEWIGVIDTSD SYTIYNQKFKGKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSGDSSVYFCARSGPGYFDVWGQGT VTVSS
376			VL	aa	ELVMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAD GVPSRFSGSGGTQYSLKINSIQPEDFGTYTCQHFWSPTYTFGGGTKLEIK
377			scFv	aa	EVQLVEQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQGLEWIGVIDTSD SYTIYNQKFKGKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSGDSSVYFCARSGPGYFDVWGQGT VTVSSGGGGGGGGGGSELVMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQ QKQKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGSGGTQYSLKINSIQPEDFGTYTCQHFWS PTYTFGGGTKLEIK
378			molécula bipes- cífica	aa	EVQLVEQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQGLEWIGVIDTSD SYTIYNQKFKGKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSGDSSVYFCARSGPGYFDVWGQGT VTVSSGGGGGGGGGGSELVMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQ QKQKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGSGGTQYSLKINSIQPEDFGTYTCQHFWS

					<p>PYTFGGGKLEIKRTSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT EDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTVTSSGGGSGGGGSGGSGQTVVT QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPA RFSGLLGKKAALTLGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLLVLHHHHHH</p>
379	D2C	CDH3-13 x12C HALB		aa	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQAPGKGLEWVGVITGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLLTVTSSGGGSGGGGSGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLY SSNQKNYFAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRSGSGGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQQYYSYPTFGQGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTVTSSGGGSGGGGSG GGGSGTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLLTVL PGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIATAQYLLQCPQFEDHVKLVEVTEFA KTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHK DDNPNLPRLVREVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAIRRRPHYFYAPELFFAKRYKA AFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCSLQKFGERAFKAWAVARL SQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCCHGDLLECAADDRADLAKYICENQDSISSKLLK ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYE YARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQ NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKCKHPEAKRM PCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFN</p>

				<p>AETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKK ADDKETCFAEEGKKLVAAASQAALGL</p>
380	D2C	CDH3-13 x12C HALB- variante 1	aa	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQAPGKGLEWVGVWVTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WQGQTLVTVSSGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLY SSNQKNYFAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFSGSGGTDFTLTITSLQAEDV AVYYCQYYYSYPYTFGQGTLEIKSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGSG GGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPAREFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL PGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAYQLQCQPFEDHVKLVNEVTEFA KTCVADESAENCDSLHHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAIRRHYPFYAPELLFFAKRYKA AFTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCAQLQKFGERAFKAWAVARL SQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCCHGDLLLECAADDRADLAKYICENQDSISSKLLK ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYE YARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQ NCELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRM PCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFN AGTFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAAAMDDFAAFVEKCKK KADDKETCFAEEGKKLVAAASQAALGL</p>

381	D2C	CDH3-13 x12C -LY- FcB-CH	aa	<p>QRFVTGHHFGLYPANGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINW VRQAPGKGLEWVGVIWTTGGTNYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTA VYYCAKSRGVYDFDGRGAMDYWGQGLTVTSSSGGGGGGGGSDIVMTQS PDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYFAWYQQKPGPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGTKEIKSGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNKY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDAVYYCVRHGFNGNSIYSYWA YWGGQGLTVTSSSGGGGGGGGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAV TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGCTKLTVLGGGGGSRFCTGHHFGLHPCNGP</p>
382	D2C	CDH3-13 x12C -LH- FcB-CH	aa	<p>QRFVTGHHFGLHPANGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINW VRQAPGKGLEWVGVIWTTGGTNYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTA VYYCAKSRGVYDFDGRGAMDYWGQGLTVTSSSGGGGGGGGSDIVMTQS PDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYFAWYQQKPGPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGTKEIKSGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNKY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDAVYYCVRHGFNGNSIYSYWA YWGGQGLTVTSSSGGGGGGGGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAV TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGCTKLTVLGGGGGSRFCTGHHFGLHPCNGP</p>
383	D2C	CDH3-13 x12C -LH-	aa	<p>QRFVTGHHFGLHPANGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINW VRQAPGKGLEWVGVIWTTGGTNYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTA</p>

384	D2C	CDH3-13 xI2C -LY- FcB-LH	aa		<p>VYYCAKSRGVYDFDGRGAMDYWGQGTTLVTSSGGGSGGGGGGSDIVMTQS PDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYFAWYQQKPGPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGTKEIKSGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWGQGTTLVTSSGGGSGGGGSGQTVVTQEPSTLTVSPGGTTLTTCGSSTGAV TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGRQFVTGHFGGLHPANGP</p> <p>QRFTGHFGGLYPANGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINW VRQAPGKGLEWVGVIWTGGGTNYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTA VYYCAKSRGVYDFDGRGAMDYWGQGTTLVTSSGGGSGGGGGGSDIVMTQS PDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYFAWYQQKPGPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGTKEIKSGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWGQGTTLVTSSGGGSGGGGSGQTVVTQEPSTLTVSPGGTTLTTCGSSTGAV TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGRQFVTGHFGGLHPANGP</p>
385	D2C	CDH3-13 xI2C -CH- FcB-LH	aa		<p>QRFTGHFGGLHPCNCGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINW VRQAPGKGLEWVGVIWTGGGTNYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTA VYYCAKSRGVYDFDGRGAMDYWGQGTTLVTSSGGGSGGGGGGSDIVMTQS PDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYFAWYQQKPGPPKLLIYWASTRESGV</p>

386	D2C	CDH3-13 x12C -CH- FcB-LY	aa		<p>PDRFSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQGTKEIKSGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDAVYYCVRHGFNGNSYISYWA YWGQGTLLVTVSSGGGGGGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTTLTTCGSSTGAV TSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGTKFLAPGTPAREFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGGSRFVTGHFGGLHPANGP</p>
					<p>QRCTGHFGGLHPCNCGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINW VRQAPGKGLEWVGVIWTTGGTNYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTA VYYCAKSRGVYDFDGRGAMDYWGQGTLLTVSSGGGGGGGGGSGGSDIVMTQS PDSLAVSLGERATINCKSSQSLYSSNQKNYFAWYQQKPGPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQGTKEIKSGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDAVYYCVRHGFNGNSYISYWA YWGQGTLLVTVSSGGGGGGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTTLTTCGSSTGAV TSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGTKFLAPGTPAREFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGGSRFVTGHFGGLYPANGP</p>
387	D2C	CDH3-13 x12C -156	aa		<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQAPGKGLEWVGVIWTTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLLVTVSSGGGGGGGGGSGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLY SSNQKNYFAWYQQKPGPPKLLIYWASTRESGVPRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQQYYSPYTFGQGTKEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY</p>

388	D2C	CDH3-13 x12C -LY- FcB-CH- 156			LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFNSYISYWAYWGQGTLTVTSSGGGGGGGGSG GGGSQTVVTQEPSTVSPGGTTLTCCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGCTKLTVL GGGGSGGSRDWDFDVFGGTPVGGP
				aa	QRFVTGHFGGLYPANGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINW VRQAPGKGLEWVGVIWTTGGTNYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTA VYYCAKSRGVYDFDGRGAMDYWGQGTLTVTSSGGGGGGGGGGGGSDIVMTQS PDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYFAWYQKPGQPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSYPYTFGQGTKEIKSGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFNSYISYWA YWQGTTLVTSSGGGGGGGGGGGGSTVVTQEPSTVSPGGTTLTCCGSSTGAV TSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGCTKLTVLGGGGGSRFCTGHFGGLHPCNNGGGGGGSRD WDFDVFGGTPVGGP
389	D2C	CDH3-13 x12C -CH- FcB-LY- 156		aa	QRFCTGHFGGLHPCNNGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINW VRQAPGKGLEWVGVIWTTGGTNYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTA VYYCAKSRGVYDFDGRGAMDYWGQGTLTVTSSGGGGGGGGGGGGSDIVMTQS PDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYFAWYQKPGQPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSYPYTFGQGTKEIKSGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFNSYISYWA

					YWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGQTVVVTQPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAV TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGGQRFTGHFGGLYPANGGGGGGGGSRD WDFDVFGGGTPVGGP
390			humano	aa	HTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVF
391			cynomol gus	aa	HTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVF
392			artificial	aa	GGGG
393			artificial	aa	GGGGS
394			artificial	aa	GGGGQ
395			artificial	aa	SGGGGS
396			artificial	aa	PGGGGS
397			artificial	aa	PGGDGS

398		enlazador 7	artificial	aa	GGGGSGGGGS
399		enlazador 8	artificial	aa	GGGGSGGGGS
400		enlazador 9	artificial	aa	GGGGSGGGSGGGGS
401		enlazador 10 (G ₄ S) ₄	artificial	aa	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
402		enlazador 11 (G ₄ S) ₅	artificial	aa	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
403		enlazador 12 (G ₄ S) ₆	artificial	aa	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
404		enlazador 13 (G ₄ S) ₇	artificial	aa	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
405		enlazador 14 (G ₄ S) ₈	artificial	aa	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
406		Fc mono- mero-1 +c/-g	artificial	aa	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYVTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
407		Fc mono-	artificial	aa	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK

					TISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLSP
408				aa	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
409				aa	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLSP
410				aa	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
411				aa	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN

					YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
412	Fc monó-mero-7 +c/+g	artificial	aa		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
413	Fc monó-mero-8 +c/+g/ delGK	artificial	aa		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
414	scFc-1	artificial	aa		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
415	scFc-2	artificial	aa		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK

[illegible]

418	seFc-5	artificial	aa	<p> LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP </p> <p> DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGGGSDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK </p>
419	seFc-6	artificial	aa	<p> DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGGGSDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP </p>

420		scFc-7	artificial	aa	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGSGGG DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSV VLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
421		scFc-8	artificial	aa	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGSGGG LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVL TVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
422	D2C	CDH3-11 x12C -scFc	Molécule HLE bipes- cifica	aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLSSYPINWVRQAPGKGLEWVSVIWTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLVTVSSGG SSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRFGSGSGGTDFLTITISLQAEDV

				<p>AVYYCQYYSYPTFGQGTKEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF</p> <p>TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY</p> <p>LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSSGGGGGGGGSG</p> <p>GGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT</p> <p>KFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAFYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL</p> <p>GGGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLPPKPDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK</p> <p>FNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP</p> <p>APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP</p> <p>ENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL</p> <p>SPGKGG</p> <p>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST</p> <p>YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE</p> <p>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV</p> <p>KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
				<p>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVTSITSPINWIRQPPGKGLEWIGVIWVGGTN</p> <p>YNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSCLKSSVTAADTAVYYCARSRGVYDFDGRGAMDYWG</p> <p>QGTLVTVSSGG</p> <p>QKNYLAWYQQKPGQPPLLIIYWASTRESGVPDFRFGSGSGGTDFTLTITSSLQAEDVAV</p> <p>YYCQYYSYPTFGQGTKEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTF</p> <p>NSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQ</p> <p>MNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLLVTVSSGGGGGGGGGGGG</p> <p>GSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTF</p> <p>IAPGTPARESGSLGGKAALTLSGVQPEDEAFYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG</p>

					GGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRC VSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
					QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSITSPINWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGGTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARSRGVYDFDGRGAMDYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGGGGSDIVMTQSPASLA VSLGERATINCKSSQSLLYSNN QKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFGSGSGTDFTLTISIQAIEDVAV YYCQQYYSPYTTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAAGFTF NKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAITY ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGG GSQT VV TQEP SL TV SP GG TV TL TCG SST GA VTSG NY PN WV QQ K PG A PR GL IG GTKF LAPGT PAR FSGSL LG GKAALT LSGV QP EDEAE YCY VL WY SN RW VF GG GT KL TV LGG GGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG

425	D2C	CDH3-13 xI2C -scFc	Molécula HLE bienespe- cífica	aa		PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRC VSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
						EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQAPGKGLVGVVGTGGGT NYASSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDY WGQGTLLVTVSSGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLY SSNQKNYFAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRFGSGSGTDFLTITSLQAEDV AVYYCQYYYSYPYTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAASGF TFNKYAMNWWVRQAPGKGLVVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGFNGSYISYWAYWVGQGTLLTVSSGGGGGGGGSGG GGGQTVVVTQEPSLTVSPGGTIVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLSGVQPEDEAEYCYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL GGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKGG PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

426	D2C	CDH3-14 x12q scFc	Molécula HLE bipes- cífica	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSSGGSITSPINWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGGTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARSRGVYDFDGRGAMDYWG QGTLVTSSGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSN QKNYLAWYQQKPGQPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLQAEDVAV YYCQQYYSPYTFGQGTKEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGG GSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFK LAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYVCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGDKTHTCCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGG PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRC VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
427	D2C	CDH3-14 x12C -scFc	Molécula HLE bipes- cífica	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSSGGSITSPINWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGGTN YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARSRGVYDFDGRGAMDYWG QGTLVTSSGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSN QKNYLAWYQQKPGQPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLQAEDVAV YYCQQYYSPYTFGQGTKEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF

					<p>NKYAMNVVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGG GSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFK LAPGTPARFSGSLGGKAAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGLTVLGG GGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGG PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRC VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
428	D3A	CDH3-24 xF12q scFc	Molécula HLE blespe- cífica	aa	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTIYNQKFQGRVTMTTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGPGYFDVWGQG TMVTVSSGG YQKPGKAPKLLIYNNAKTLADGVPSRFSGSGSGTEFTLKISSLPEDFATYYCQHFWS TPYTFGGQTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFS GSLGGKAAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGLTVLGGGGGGGGGGGGGG PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV</p>

				<p>HNAAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</p> <p>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPV</p> <p>LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSG</p> <p>GGSGGG</p> <p>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL</p> <p>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT</p> <p>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV</p> <p>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
				<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRRQAPGQGLEWMGVIDTS</p> <p>DSYTIYNQKFQGRVTMTTRDTSTAYMELSSRSEDTAVYYCARSGPGYFDVWVGQG</p> <p>TMVTVSSGG</p> <p>YQKPKGAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGGTEFTLKISLQPEDFATYYCQHFWS</p> <p>TPYTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNW</p> <p>VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAITYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE</p> <p>DTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG</p> <p>EPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPAR</p> <p>FSGLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHT</p> <p>CPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE</p> <p>VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</p> <p>KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTP</p> <p>VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS</p> <p>GGSGGG</p> <p>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTV</p>

		x12C -scFc	HLE bipes- cifica	DSYTIYNQKFKGRVTMTDSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARSGPGYFDVWGQG TMVTVSSGGGGGGGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASENIYSYLA YQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHHY TPYTFGQGTKEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE DTAVYYCVRHGNFGNSIYSYWAYWGQGTLLVTVSSGGGGGGGGGSGTQTVVTQ EPLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPAR FSGLLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGS GGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
432	D3A	CDH3-26 xF12q - scFc	Molécula HLE bipes- cifica	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTIYNQKFKGRVTMTDSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARSGPGYFDVWGQG TMVTVSSGGGGGGGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASENIYSYLA YQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHHY GTPYTFGQGTKEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLSLKTED

					TAVYYCVRHGNFNSYVSWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQTVVVTQ EPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGS GGGGSGGGSGGGSGGGGGGSKTKHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLTM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
					QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTYNQKFQGRTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSGPGYFDDVWGQG TMVTVSSGGGGSGGGGGGGDIQLTQSPSFLASVGDRTITCRASENIYSYLAW YQKQPGKAPKLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHHY GTPYTFGGQGTLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT EDTAVYYCVRHGNFNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQTVVTV QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA RFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTH TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVI TVI HODWVNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK

434	D3A	CDH3-27 xF12q scFc	Molécula HLE bipes- cífica	aa	AKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLPFPKPKDITL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPCPEEQYGSTYRCVSVL VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQV LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
					QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVDTIS DSYTIYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSGPGYFDVWVGQ TMVTVSSGGSGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASENIYSYLA YQKPKGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAITYCQHHYG TPYTFGQGTLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSCAASGFTFNYSYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWAYWGQGTLVTVSSGGSGGGSGGGSGGSGTIVVTQE PSLTVSPGGTIVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFS GSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLPFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLPFPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPCPEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLT

					CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
435	D3A	CDH3-27 x12C -scFc	Molécula HLE biespe- cífica	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDTS DSYTIYAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSGPGYFDVWGGQ TMVTVSSGGGGGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASENIYSYLAW YQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYG TPYTFGGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE DTAVYYCVRHGNGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSSGGGGGGGGSGGGSQTVVTQ EPLSLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPAR FSGLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCYVLWYSNRWVFGGGLKTLTVLGGGDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGS GG ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
436		Hexa-his	artificial	aa	HHHHHH

437	P156	artificial	aa	RDWDFDVFGGGTPVGG
438	FcRn BP lineal	artificial	aa	QRFVTGHFGGLXPANG
439	FcRn BP-Y lineal	artificial	aa	QRFVTGHFGGLYPANG
440	FcRn BP-H lineal	artificial	aa	QRFVTGHFGGLHPANG
441	FcRn BP-H del núcleo	artificial	aa	TGHFGGLHP
442	FcRn BP-H cíclico	artificial	aa	QRFCTGHFGGLHPCNG
443	HALB	humano	aa	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIATAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD ESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAATFEC QAADKAAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCSLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPK AEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCCHGDLLEACADDDRADLAKYICENQDSISSKLECECKP LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRH PDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEF

						EQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE YLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTF HADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKE TCFAEEGKKLVAAASQAALGL
444	HALB variante 1	humano	aa			DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD ESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCEC QAADKAAACLLPKLDELIRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPK AEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSSSKLKECCEKP LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA KDVFLGMFLYFYARRH PDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCSELF EQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE YLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAAAMDDFAAFVEKCKKADDK ETCFAEEGKKLVAAASQAALGL
445	CDR-L1 de F6A	artificial	aa			GSSTGAVTSGYYPN
446	CDR-L2 de F6A	artificial	aa			GTKFLAP
447	CDR-L3 de F6A	artificial	aa			ALWYSNRWV

456		H2C		artificial	aa		ALWYSNRWV
457		CDR-L3 de H2C		artificial	aa		KYAMN
458		CDR-H1 de H2C		artificial	aa		RIRSKYNNYATYYADSVKD
459		CDR-H2 de H2C		artificial	aa		HGNFGNSYISYWAY
460		VH de H2C		artificial	aa		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY WAYWGQGTLVTVSS
461		VL de H2C		artificial	aa		QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLA PGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
462		VH-VL de H2C		artificial	aa		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY WAYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGQTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTG AVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED EAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL

463		CDR-L1 de H1E	artificial	aa	GSSTGAVTSGYYPN
464		CDR-L2 de H1E	artificial	aa	GTKFLAP
465		CDR-L3 de H1E	artificial	aa	ALWYSNRWV
466		CDR-H1 de H1E	artificial	aa	SYAMN
467		CDR-H2 de H1E	artificial	aa	RIRSKYNNYATYYADSVKG
468		CDR-H3 de H1E	artificial	aa	HGNFGNSYLSFWAY
469		VH de H1E	artificial	aa	EVQLVESGGGLEQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSF WAYWGQGTLLVTVSS
470		VL de H1E	artificial	aa	QTVVTQEPSTLVSPGGTTLTTCGSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLA PGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
471		VH-VL de H1E	artificial	aa	EVQLVESGGGLEQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSF WAYWGQGTLLVTVSSGGGGGGGGGSGTQVVTQEPSTLVSPGGTTLTTCGSSTG

					AVTSGYYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED EAEEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
472		CDR-L1 de G4H	artificial	aa	GSSTGAVTSGYYPN
473		CDR-L2 de G4H	artificial	aa	GTKFLAP
474		CDR-L3 de G4H	artificial	aa	ALWYSNRWV
475		CDR-H1 de G4H	artificial	aa	RYAMN
476		CDR-H2 de G4H	artificial	aa	RIRSKYNNYATYYADSVKG
477		CDR-H3 de G4H	artificial	aa	HGNFGNSYLSYFAY
478		VH de G4H	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGLSLKLSCAASGFTFNRYAMNWWVQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLS YFAYWGQGLVTVSS
479		VL de G4H	artificial	aa	QTVVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLA PGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL

480	VH-VL de G4H	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLS YFAYWGQGTLLVTVSSGGGGGGGGGSGQTIVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTSGYYYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
481	CDR-L1 de A2J	artificial	aa	RSSTGAVTSGYYPN
482	CDR-L2 de A2J	artificial	aa	ATDMRPS
483	CDR-L3 de A2J	artificial	aa	ALWYSNRWV
484	CDR-H1 de A2J	artificial	aa	VYAMN
485	CDR-H2 de A2J	artificial	aa	RIRSKYNNYATYYADSVKK
486	CDR-H3 de A2J	artificial	aa	HGNFGNSYLSWWAY
487	VH de A2J	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLS WWAYWGQGTLLTVSS

488		VL de A2J	artificial	aa	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGATDMRP SGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
489		VH-VL de A2J	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNVYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKKRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLS WWAYWGQGTLLTVSSGGGGGGGGGGGSGTQVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSST GAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGATDMRPSTGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
490		CDR-L1 de E1L	artificial	aa	GSSTGAVTSGYYPN
491		CDR-L2 de E1L	artificial	aa	GTKFLAP
492		CDR-L3 de E1L	artificial	aa	ALWYSNRWV
493		CDR-H1 de E1L	artificial	aa	KYAMN
494		CDR-H2 de E1L	artificial	aa	RIRSKYNNYATYYADSVKS
495		CDR-H3 de E1L	artificial	aa	HGNFGNSYTSYYAY

496		VH de E1L	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYTSY YAYWGQGTLLTVTVSS
497		VL de E1L	artificial	aa	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLA PGTPARFSGSLGKKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
498		VH-VL de E1L	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYTSY YAYWGQGTLLTVSSGGGGGGGGGSGQTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTG AVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGKKAALTLSGVQPED EAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
499		CDR-L1 de E2M	artificial	aa	RSSTGAVTSGYYPN
500		CDR-L2 de E2M	artificial	aa	ATDMRPS
501		CDR-L3 de E2M	artificial	aa	ALWYSNRWV
502		CDR-H1 de E2M	artificial	aa	GYAMN
503		CDR-H2	artificial	aa	RIRSKYNNYATYYADSVKE

	de E2M				
504	CDR-H3 de E2M	artificial	aa		HRNFGNSYLSWFAY
505	VH de E2M	artificial	aa		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNGYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKERFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHRNFGNSYLS WFAYWGQGTLLVTVSS
506	VL de E2M	artificial	aa		QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGATDMRP SGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
507	VH-VL de E2M	artificial	aa		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNGYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKERFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHRNFGNSYLS WFAYWGQGTLLVTVSSGGGGGGGGGSGQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSST GAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
508	CDR-L1 de F7O	artificial	aa		GSSTGAVTSGYYPN
509	CDR-L2 de F7O	artificial	aa		GTKFLAP
510	CDR-L3 de F7O	artificial	aa		ALWYSNRWV

511		CDR-H1 de F7O	artificial	aa	VYAMN
512		CDR-H2 de F7O	artificial	aa	RIRSKYNNYATYYADSVKK
513		CDR-H3 de F7O	artificial	aa	HGNFGNSYISWWAY
514		VH de F7O	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNVYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKKRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYIS WWAYWGQGLTVTVSS
515		VL de F7O	artificial	aa	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLA PGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGLTVL
516		VH-VL de F7O	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNVYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKKRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYIS WWAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGSGGGSQTIVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSS TGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQP EDEAEYYCALWYSNRWVFGGGLTVL
517		CDR-L1 de F12Q	artificial	aa	GSSTGAVTSGNYPN
518		CDR-L2 de	artificial	aa	GTKFLAP

519			F12Q			aa	VLWYSNRWV
520			CDR-L3 de F12Q	artificial		aa	SYAMN
521			CDR-H1 de F12Q	artificial		aa	RIRSKYNNYATYYADSVKG
522			CDR-H2 de F12Q	artificial		aa	HGNFGNSYVSWWAY
523			CDR-H3 de F12Q	artificial		aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WWAYWGQGTLVTVSS
524			VH de F12Q	artificial		aa	QTVVTTQEPSTLVSPGGTIVLTGSGSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLA PGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
525			VL de F12Q	artificial		aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGQTVVTTQEPSTLVSPGGTIVLTGSGS TGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL

526		CDR-L1 de I2C	artificial	aa	GSSTGAVTSGNYPN
527		CDR-L2 de I2C	artificial	aa	GTKFLAP
528		CDR-L3 de I2C	artificial	aa	VLWYSNRWV
529		CDR-H1 de I2C	artificial	aa	KYAMN
530		CDR-H2 de I2C	artificial	aa	RIRSKYNNYATYYADSVKD
531		CDR-H3 de I2C	artificial	aa	HGNFGNSYISYWAY
532		VH de I2C	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY WAYWGQGTLLTVVSS
533		VL de I2C	artificial	aa	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLA PGTPARFSGSLLGKKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
534		VH-VL de I2C	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY WAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTG

					AVTSGNYPNWWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED EAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
535		VH de F12q	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSW WAYWGQGTLLVTVSS
536		VL de F12q	artificial	aa	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLA PGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
537		VH-VL de F12q	artificial	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSW WAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTSGNYPNWWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED EAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico que comprende un primer dominio de unión humano que se une a una agrupación de epítomos de CDH3 humana en la superficie de una célula diana, en donde el primer dominio de unión también se une a CDH3 de macaco, preferiblemente a CDH3 de *Macaca fascicularis*, y que comprende un segundo dominio de unión que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T, en donde la agrupación de epítomos de CDH3 humana está comprendida dentro de las posiciones de aminoácidos 291-363 (SEQ ID NO: 36) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1, en donde los dominios de unión tienen el siguiente formato: pares de las regiones VH y las regiones VL en el formato de un scFv, y en donde la lisis redirigida de células diana a través del reclutamiento de células T por la construcción del anticuerpo implica la formación de sinapsis citolíticas y el suministro de perforina y granzimas.
2. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer dominio de unión se une a un epítipo que está comprendido en las posiciones de aminoácidos 291-327 (SEQ ID NO: 34) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1.
3. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer dominio de unión se une a un epítipo que está comprendido en las posiciones de aminoácidos 328-363 (SEQ ID NO: 35) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1, en donde el primer dominio de unión también se une preferiblemente a un epítipo que está comprendido dentro de las posiciones de aminoácidos 404-440 (SEQ ID NO: 390) de CDH3 humana como se representa en SEQ ID NO: 1.
4. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el primer dominio de unión comprende una región VH que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y una región VL que comprende CDR-L1, CDR- L2 y CDR-L3 seleccionados del grupo que consiste en:
 - a) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 149, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 150, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 151, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 152, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 153 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 154;
 - b) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 159, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 160, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 161, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 162, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 163 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 164;
 - c) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 169, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 170, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 171, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 172, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 173 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 174;
 - d) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 179, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 180, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 181, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 182, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 183 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 184;
 - e) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 189, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 190, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 191, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 192, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 193 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 194;
 - f) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 199, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 200, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 201, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 202, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 203 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 204;
 - g) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 209, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 210, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 211, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 212, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 213 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 214;
 - h) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 219, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 220, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 221, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 222, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 223 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 224;
 - i) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 229, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 230, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 231, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 232, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 233 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 234; y
 - j) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 239, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 240, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 241, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 242, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 243 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 244.
5. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3, en donde el primer dominio de unión comprende una región VH que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y una región VL que comprende CDR-L1, CDR- L2 y CDR-L3 seleccionados del grupo que consiste en:
 - a) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 279, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 280, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 281, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 282, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 283 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 284;
 - b) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 289, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 290, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 291, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 292, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 293 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 294;

- c) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 299, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 300, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 301, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 302, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 303 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 304;
- 5 d) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 309, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 310, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 311, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 312, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 313 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 314;
- e) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 319, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 320, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 321, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 322, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 323 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 324;
- 10 f) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 329, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 330, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 331, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 332, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 333 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 334;
- g) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 339, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 340, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 341, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 342, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 343 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 344; y
- 15 h) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 349, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 350, CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 351, CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 352, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 353 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 354.
- 20 6. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el primer dominio de unión comprende una región VH seleccionada del grupo que consiste en regiones VH como se representa en SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 235, y SEQ ID NO: 245 y/o en donde el primer dominio de unión comprende una región VL seleccionada del grupo que consiste en regiones VL como se representa en SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 236, y SEQ ID NO: 246.
- 25 7. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el primer dominio de unión comprende una región VH seleccionada del grupo que consiste en regiones VH como se representa en SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 315, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 335, SEQ ID NO: 345, y SEQ ID NO: 355 y/o en donde el primer dominio de unión comprende una región VL seleccionada del grupo que consiste en regiones VL como se representa en SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 306, SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 336, SEQ ID NO: 346, y SEQ ID NO: 356.
- 30 8. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde el primer dominio de unión comprende una región VH y una región VL seleccionadas del grupo que consiste en pares de una región VH y una región VL como se representa en SEQ ID NO: 155+156, SEQ ID NO: 165+166, SEQ ID NO: 175+176, SEQ ID NO: 185+186, SEQ ID NO: 195+196, SEQ ID NO: 205+206, SEQ ID NO: 215+216, SEQ ID NO: 225+226, SEQ ID NO: 235+236 y SEQ ID NO: 245+246.
- 35 40 9. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7, en donde el primer dominio de unión comprende una región VH y una región VL seleccionadas del grupo que consiste en pares de una región VH y una región VL como se representa en SEQ ID NO: 285+286, SEQ ID NO: 295+296, SEQ ID NO: 305+306, SEQ ID NO: 315+316, SEQ ID NO: 325+326, SEQ ID NO: 335+336, SEQ ID NO: 345+346 y SEQ ID NO: 355+356.
- 45 10. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4, 6 u 8, en donde el primer dominio de unión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la representada en SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 237, y SEQ ID NO: 247.
- 50 11. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5, 7 o 9, en donde el primer dominio de unión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la representada en SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 347, y SEQ ID NO: 357.
- 55 12. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el segundo dominio de unión se une a CD3 épsilon de seres humanos y de *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* o *Saimiri sciureus*.
- 60 13. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4, 6, 8, 10 o 12, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la representada en SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 238, y SEQ ID NO: 248 o que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la representada en SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 380, SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 382, SEQ ID NO: 383, SEQ ID NO: 384, SEQ ID NO: 385, SEQ ID NO: 386, SEQ ID NO:
- 65

387, SEQ ID NO: 388, SEQ ID NO: 389, SEQ ID NO: 422, SEQ ID NO: 423, SEQ ID NO: 424, SEQ ID NO: 425, SEQ ID NO: 426 y SEQ ID NO: 427.

14. La construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5, 7, 9, 11 o 12, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la representada en SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 318, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 338, SEQ ID NO: 348, y SEQ ID NO: 358.

15. Un polinucleótido que codifica una construcción de anticuerpo Fv de cadena sencilla biespecífico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

16. Un vector que comprende un polinucleótido según se define en la reivindicación 15.

17. Una célula huésped transformada o transfectada con el polinucleótido según se define en la reivindicación 15 o con el vector según se define en la reivindicación 16.

18. Un procedimiento para la producción de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, comprendiendo dicho procedimiento cultivar una célula huésped como se define en la reivindicación 17 en condiciones que permitan la expresión de la construcción de anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y recuperar del cultivo la construcción de anticuerpo producida.

19. Una composición farmacéutica que comprende una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o producida de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 18, preferiblemente para uso en la prevención, el tratamiento o la mejoría de un tumor o un cáncer, en donde el cáncer se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en carcinoma de pulmón, carcinoma de cabeza y cuello, un tumor primario o secundario del SNC, un tumor cerebral primario o secundario, linfoma primario del SNC, tumores del eje medular, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, cáncer adrenocortical, carcinoma de esófago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de ovario, NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), SCLC (cáncer de pulmón de células pequeñas), cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, carcinoma de células de transición, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer hepático, cáncer de las vías biliares, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal (gástrico, colorrectal y duodenal), cáncer del intestino delgado, cáncer del tracto biliar, cáncer de la uretra, carcinoma de células renales, carcinoma del endometrio, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer cutáneo de células escamosas, melanoma, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, osteosarcoma, mesotelioma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas linfocíticos, mieloma múltiple, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma y sarcoma de tejidos blandos, en donde la enfermedad de cáncer es preferiblemente un carcinoma de células escamosas.

20. Un kit que comprende una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, una construcción de anticuerpo producida de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 18, y/o un vector como se define en la reivindicación 16, y/o una célula huésped como se define en la reivindicación 17.

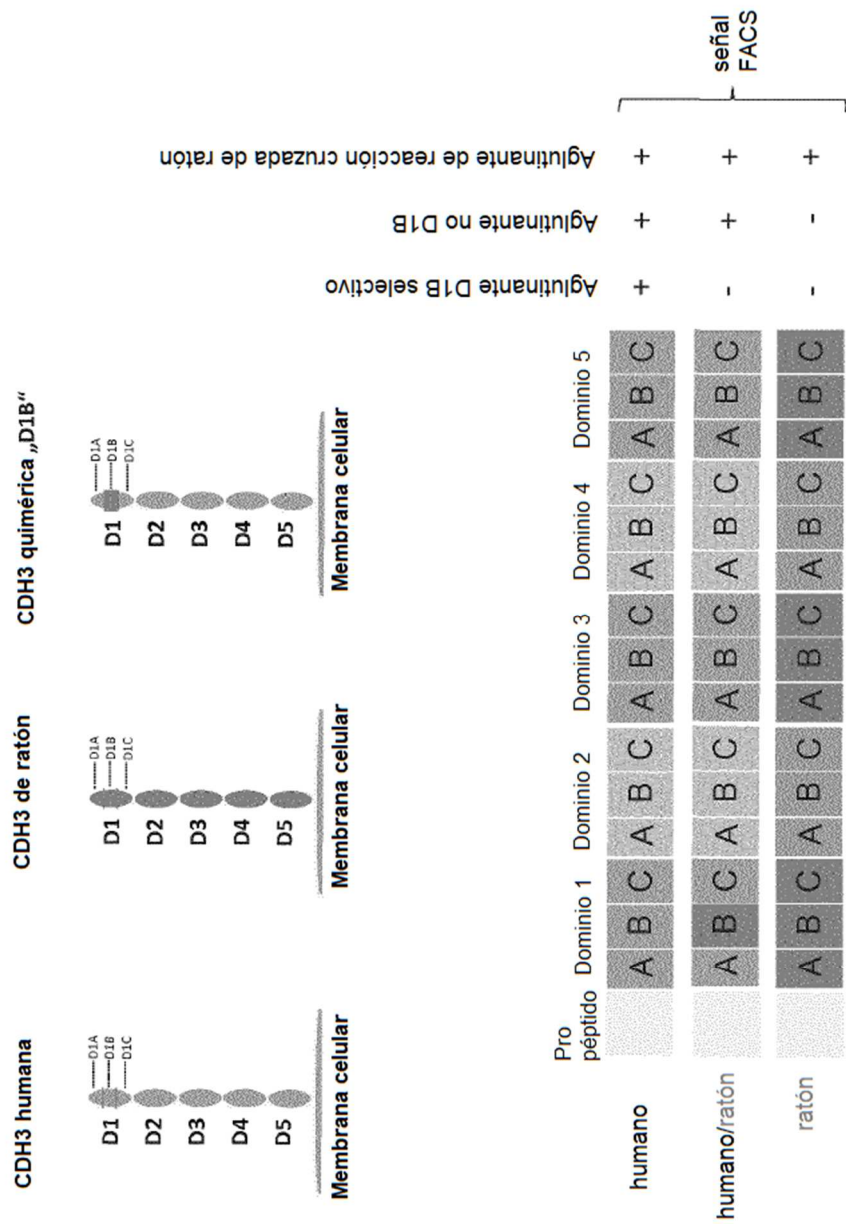


Figura 1

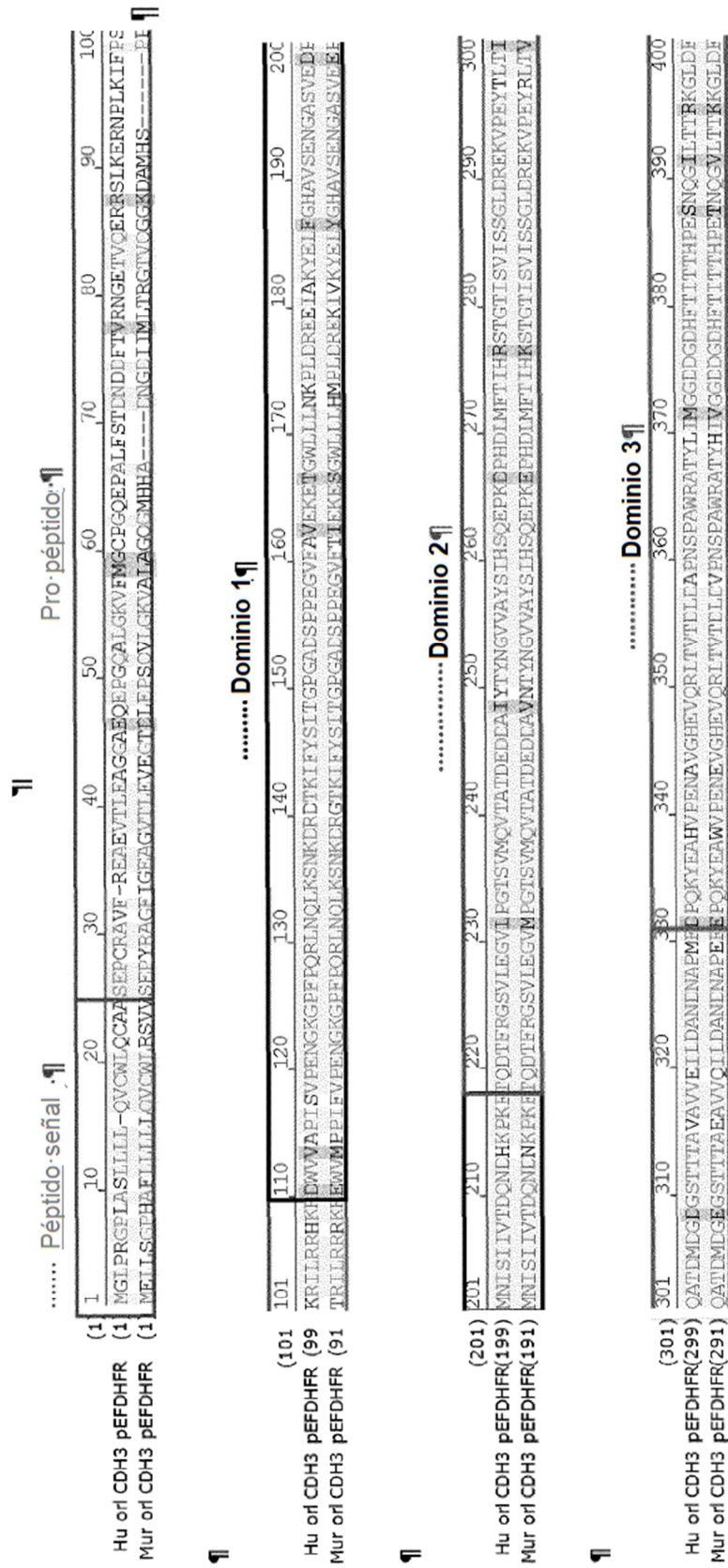


Figura 2(1)

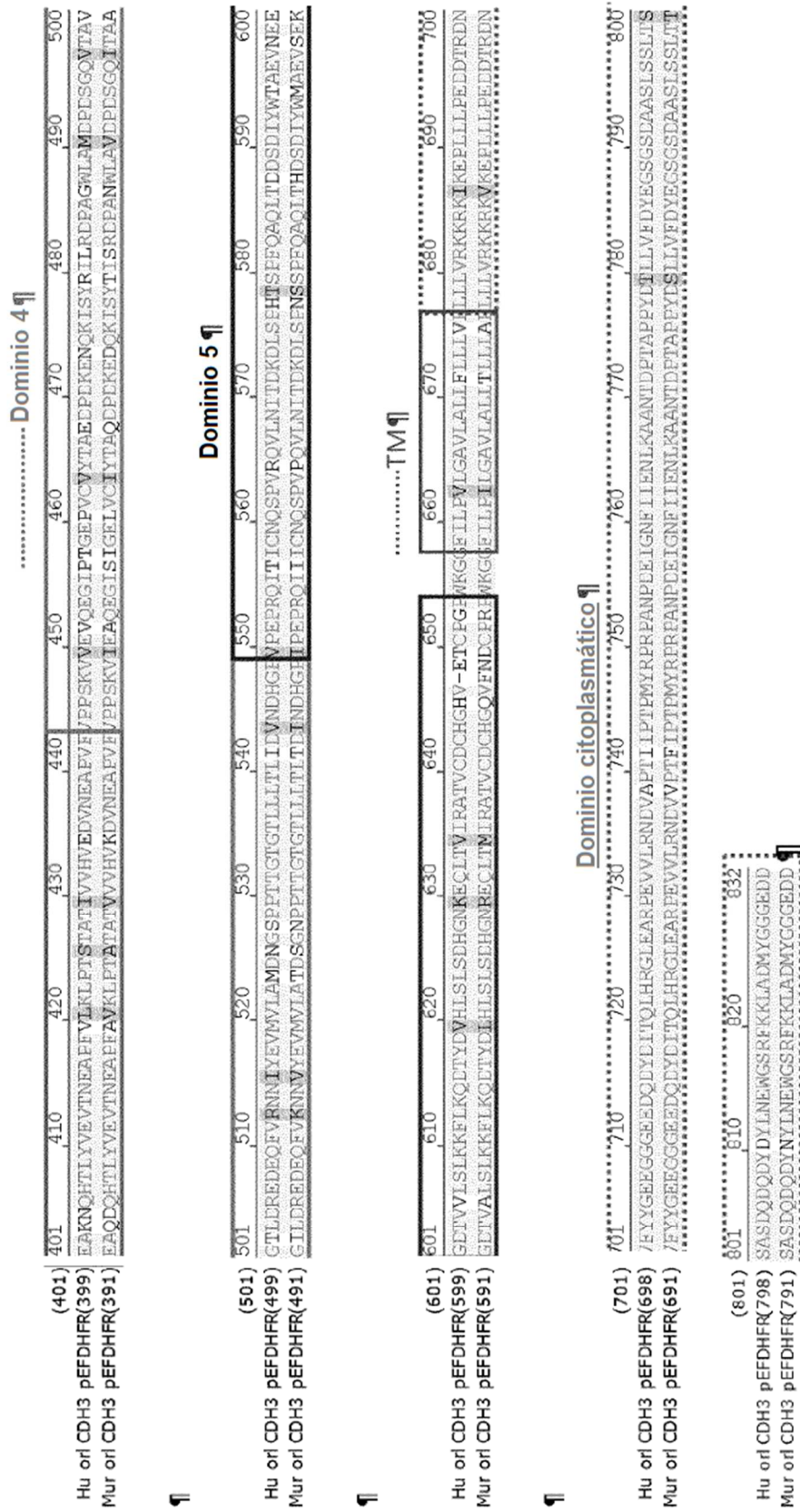
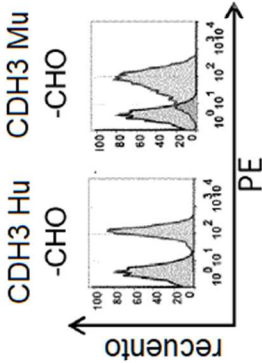


Figura 2(2)

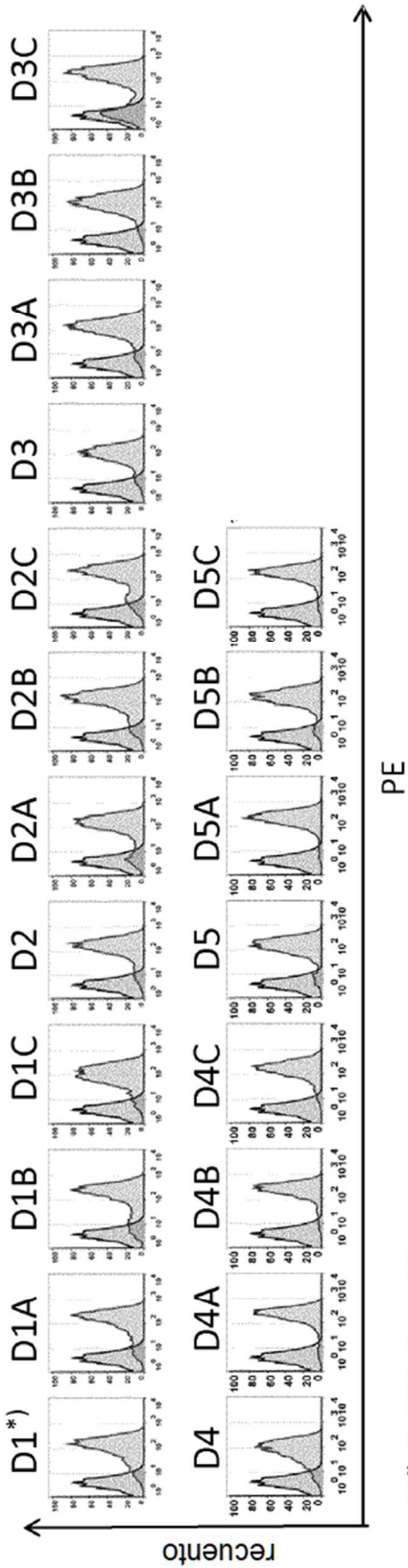
Figura 3

Construcciones de CDH3 de Mapeo de Epítomos

Expresión de CDH3 humana y murina en células CHO (controles)



Expresión de moléculas de CDH3 quiméricas en células CHO



D1*) : Hu CDH3 D1 mu -CHO
Anticuerpo: 194-G09 mlgG1 λ

Figura 4A

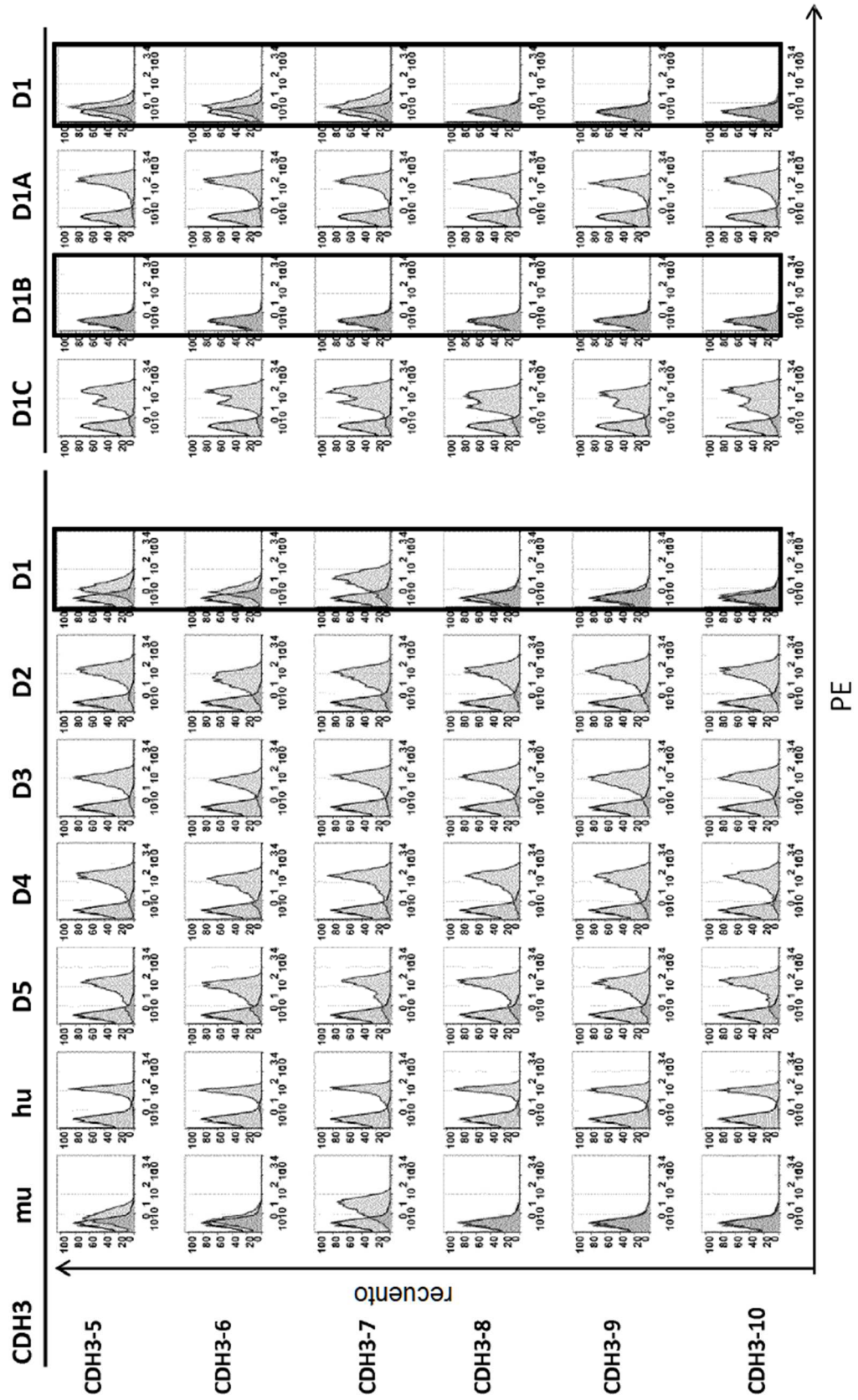


Figura 4B

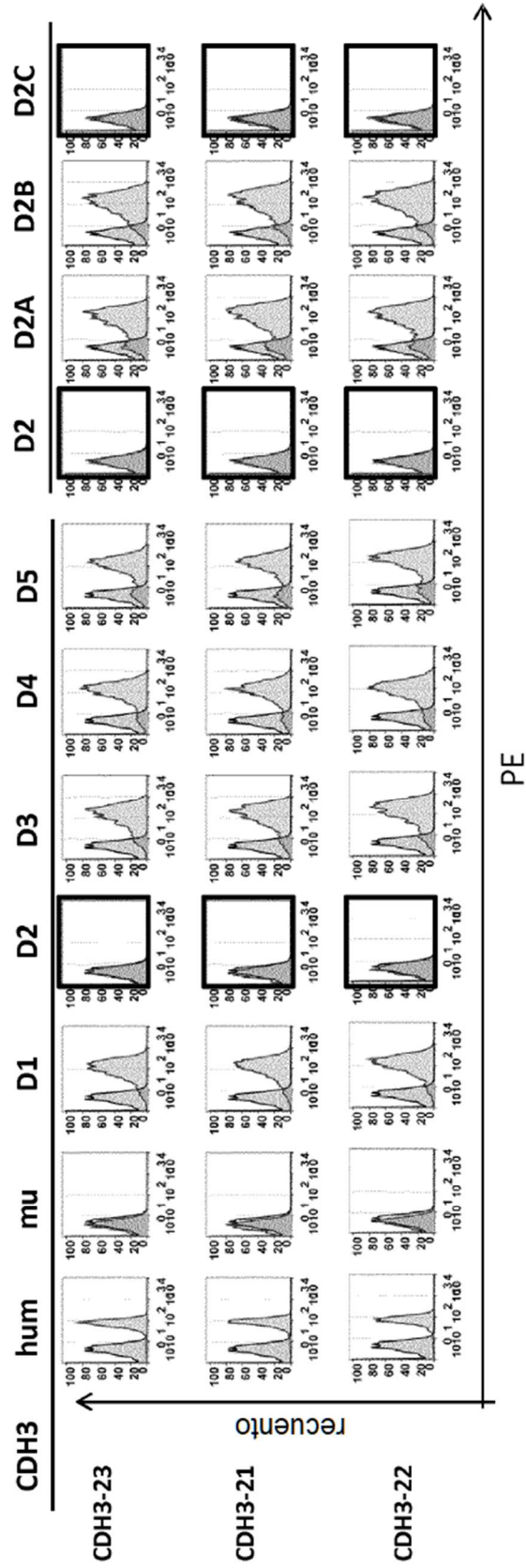
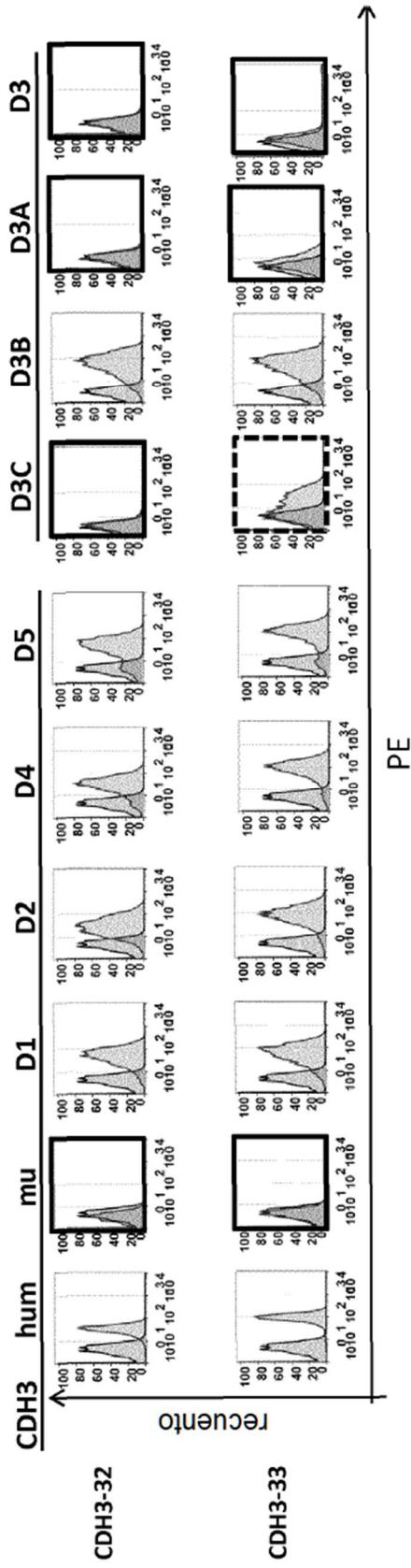
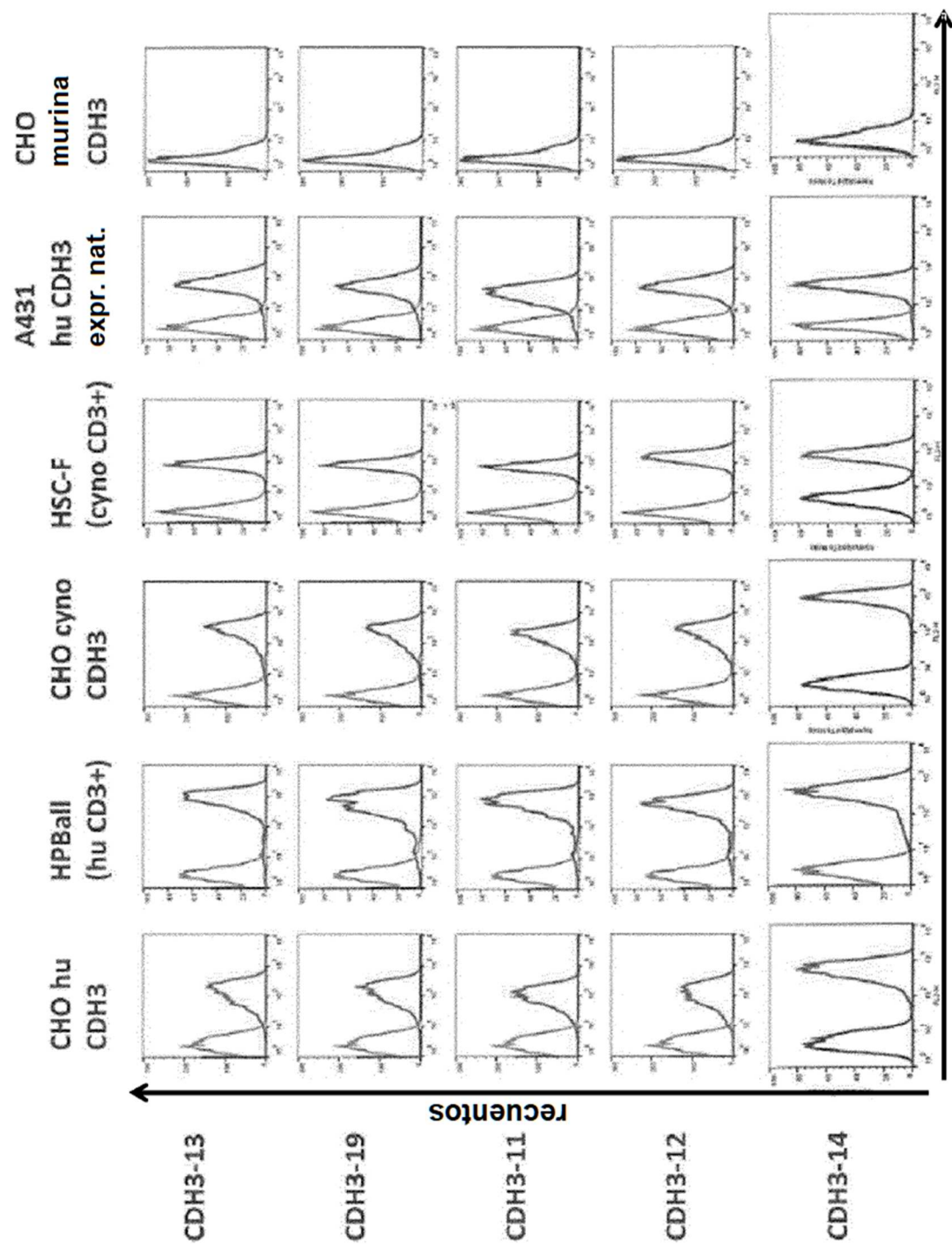


Figura 4C





Fluorescencia relativa FL2-H

Figura 5A

Figura 5B

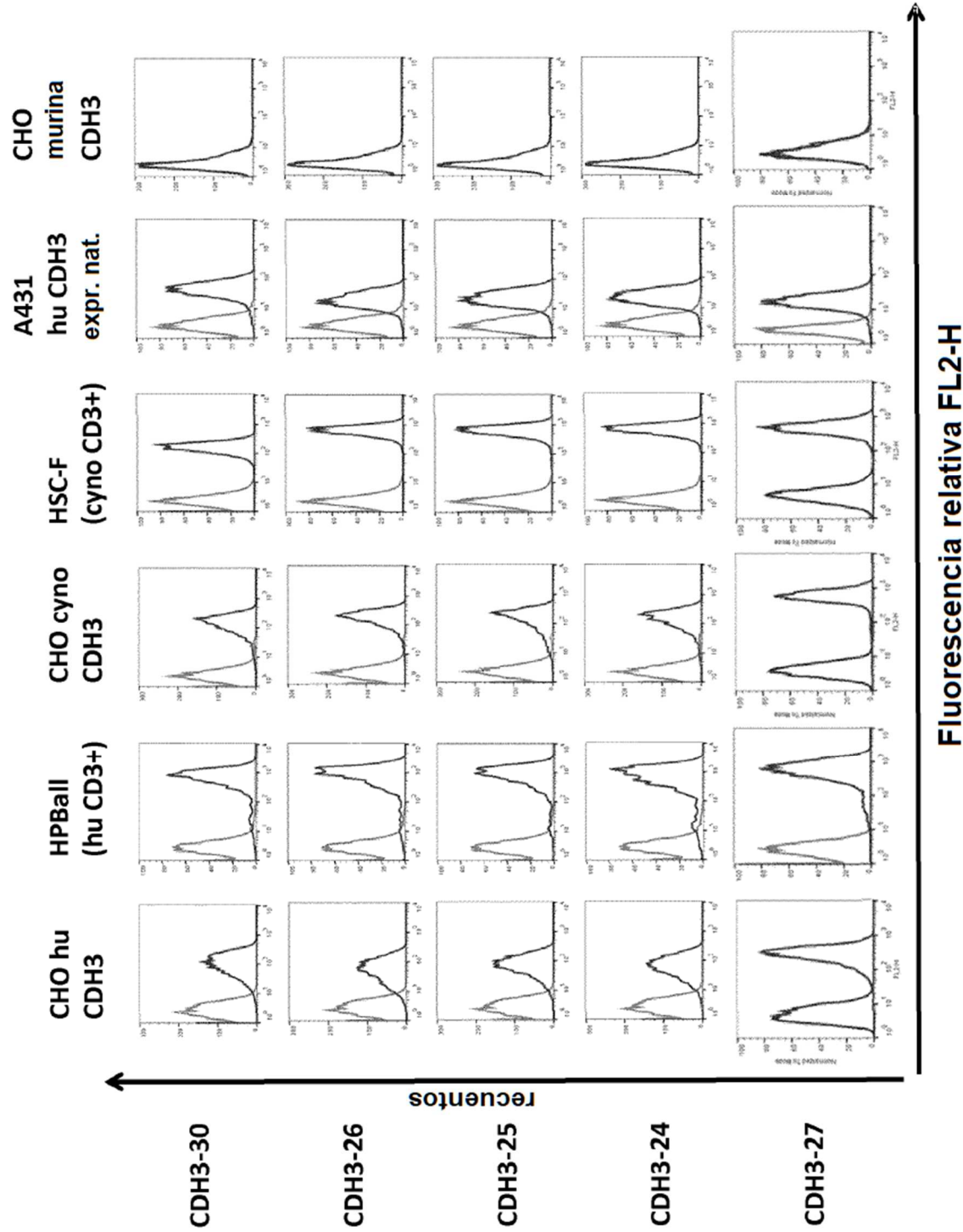


Figura 5C

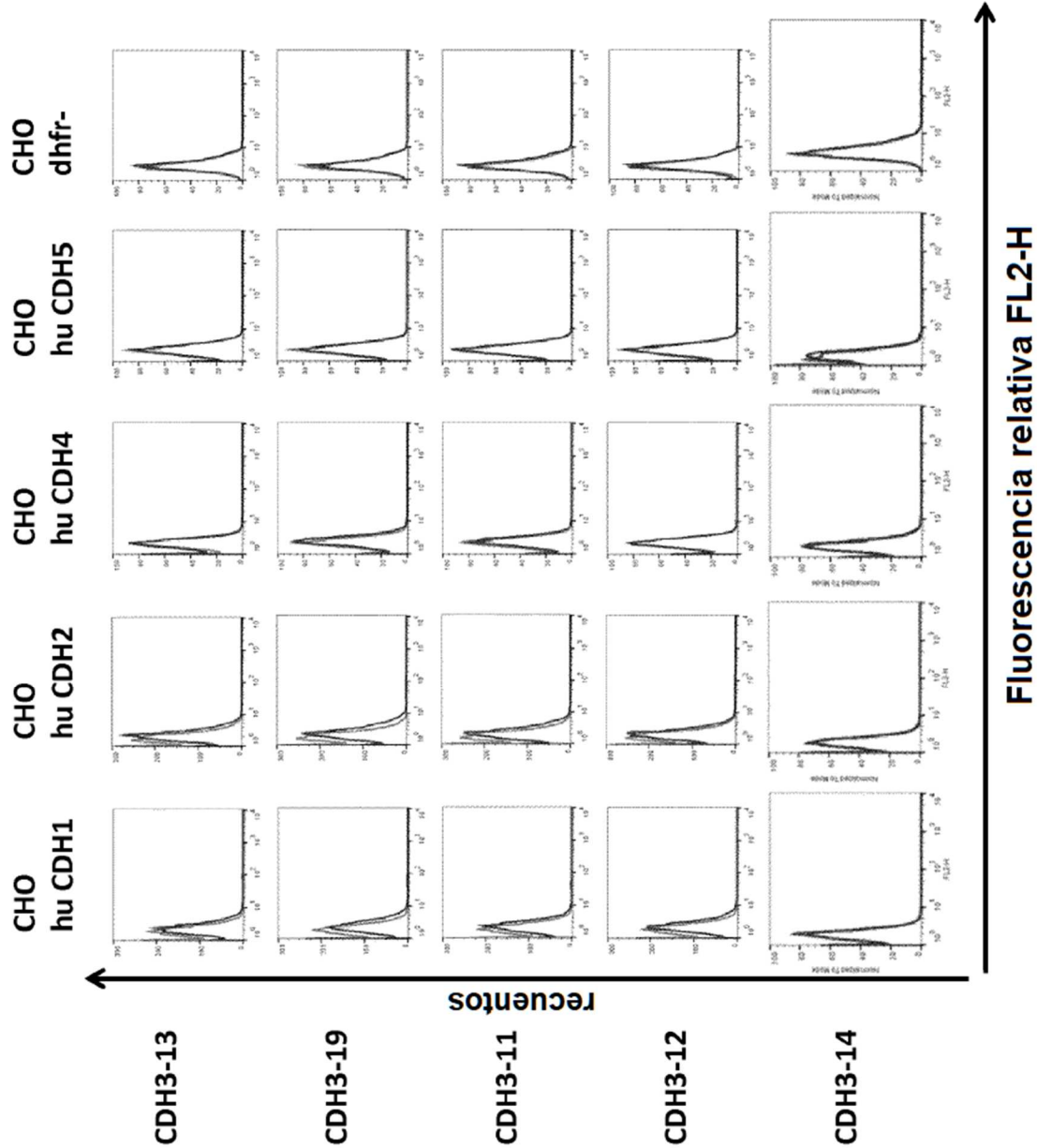
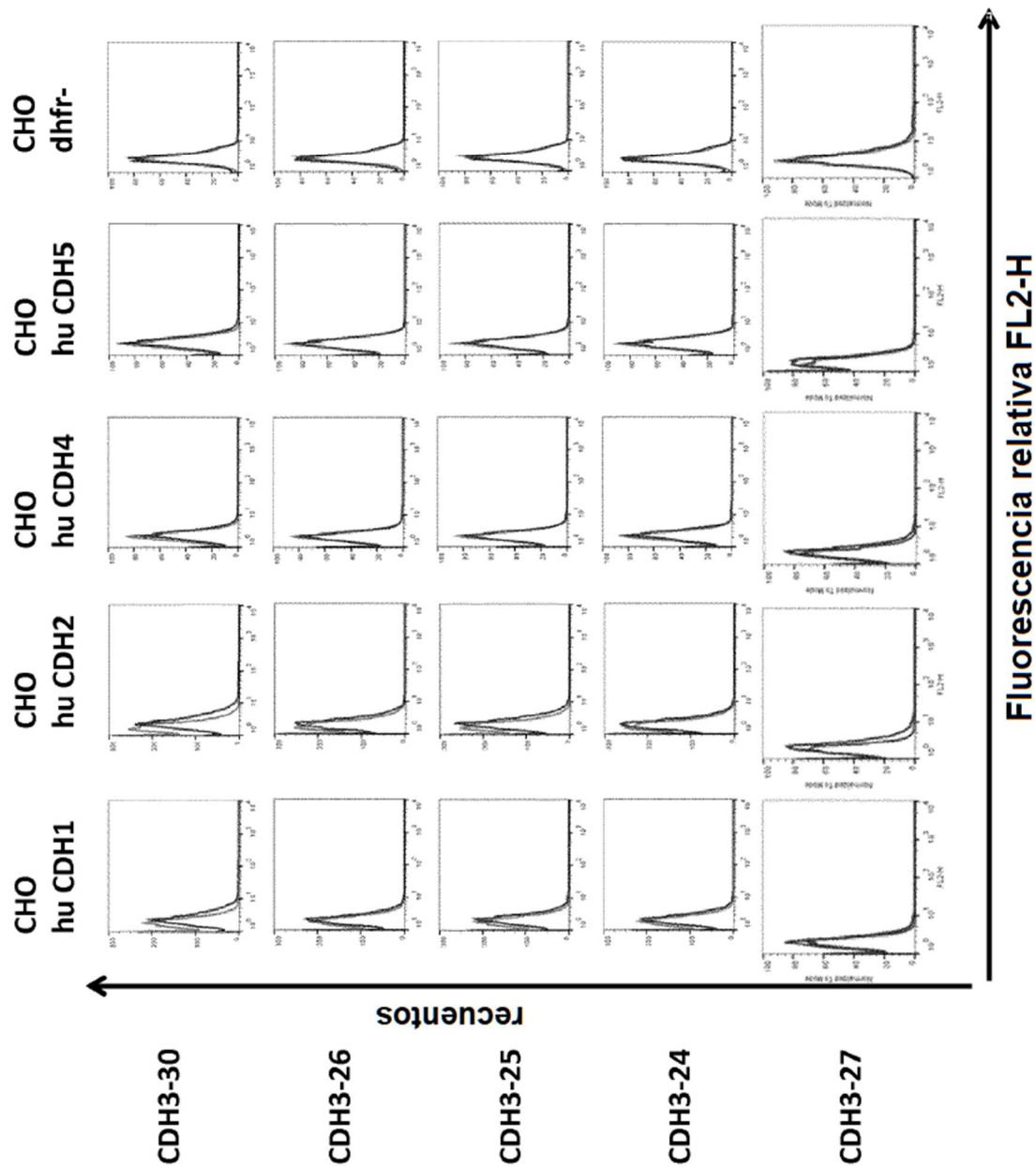


Figura 5D



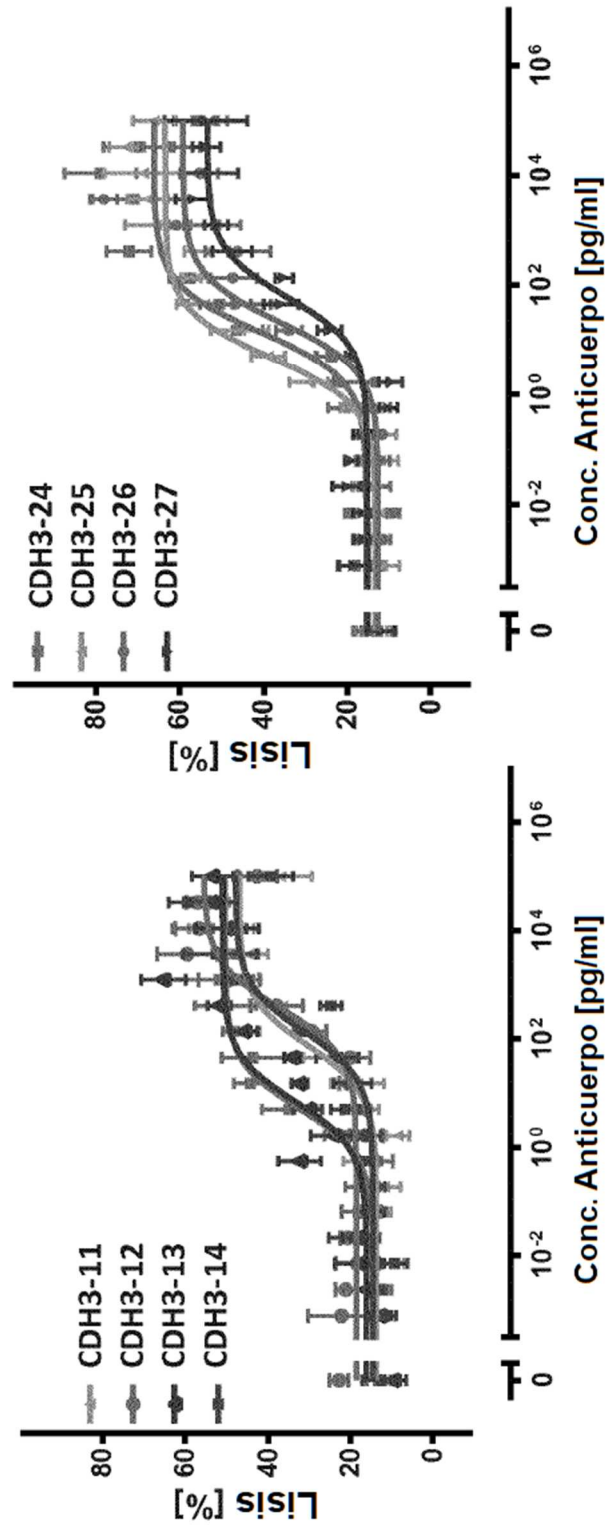


Figura 6A

Figura 6B

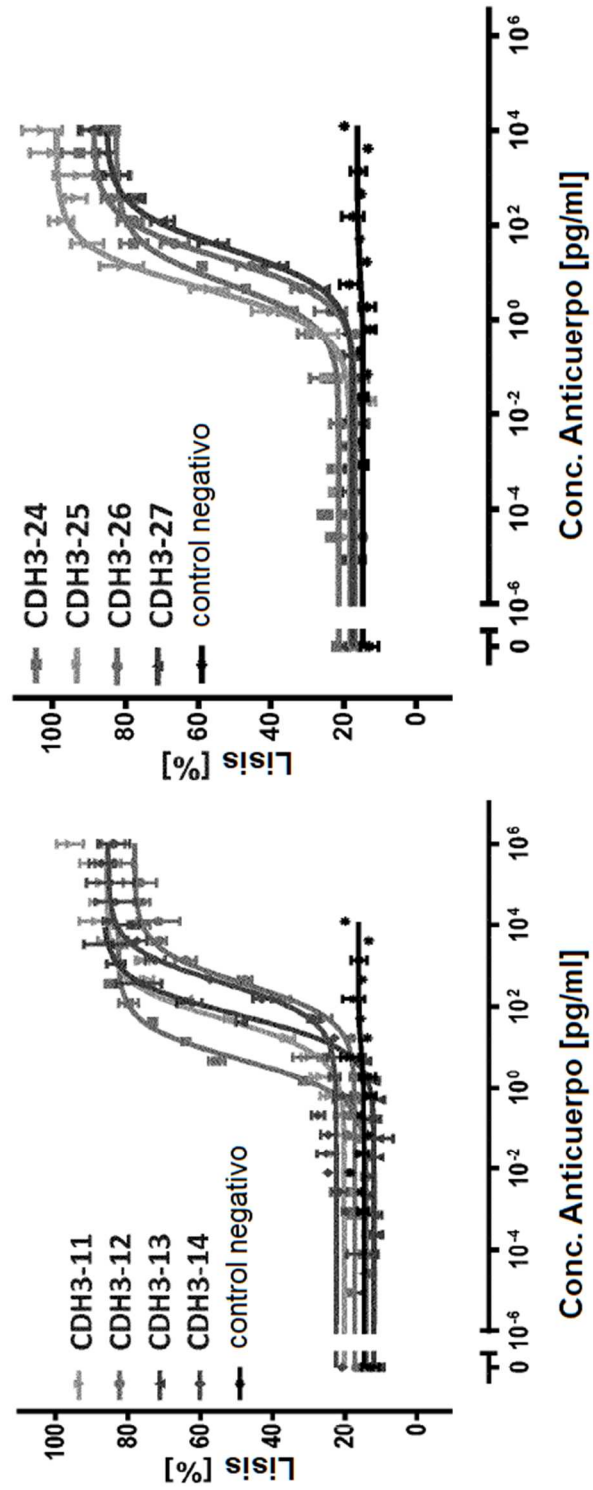


Figura 7A

Figura 7B

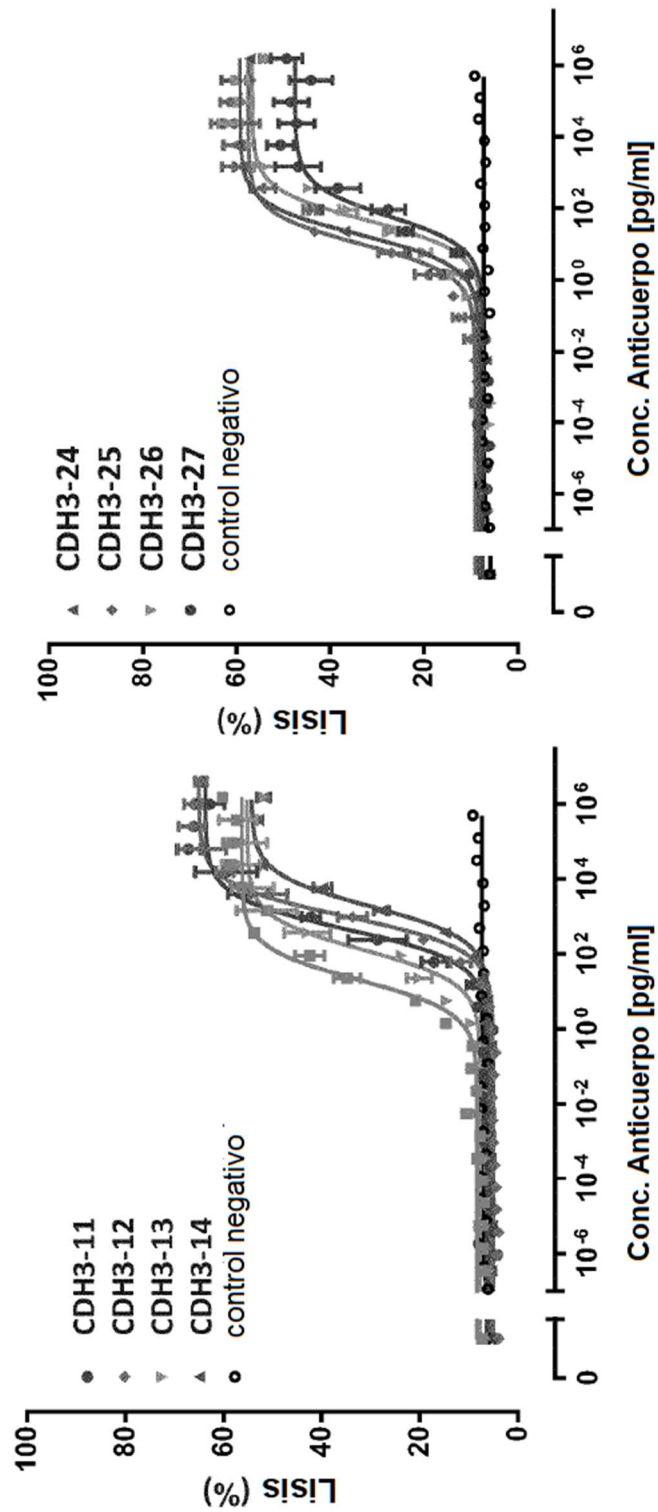


Figura 8B

Figura 8A

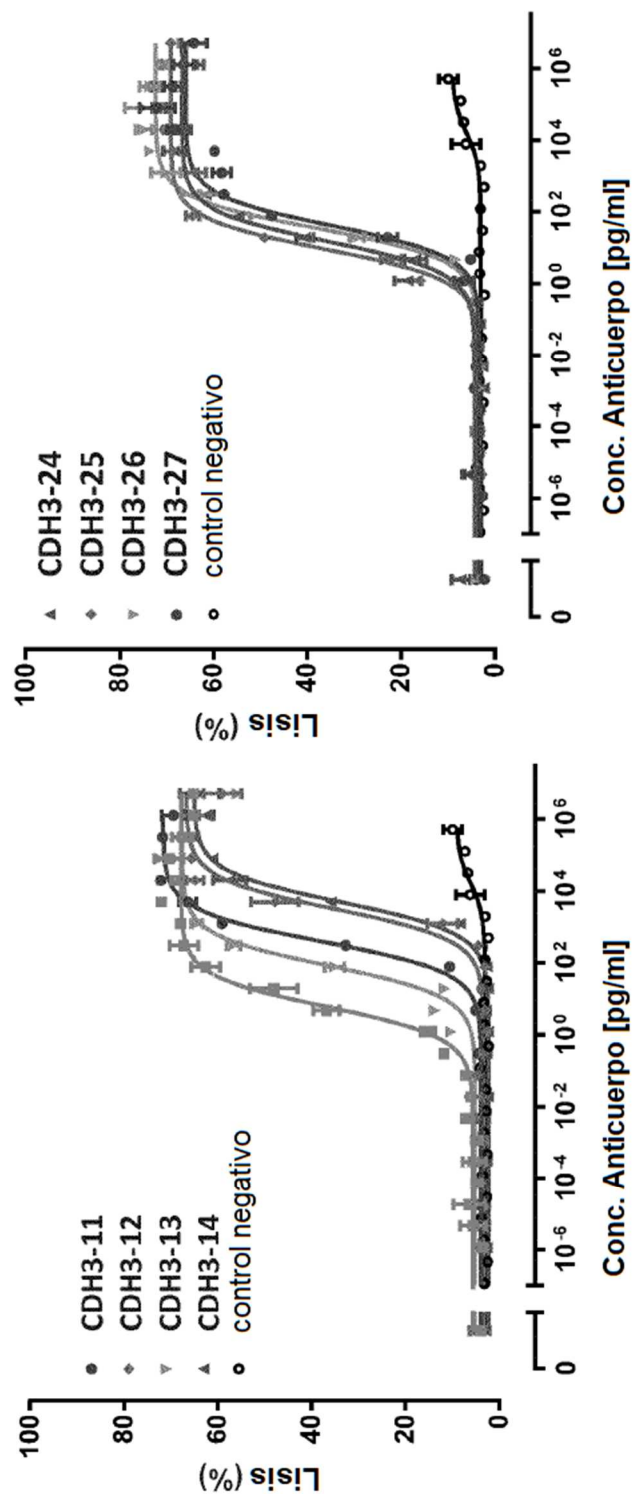


Figura 9A

Figura 9B

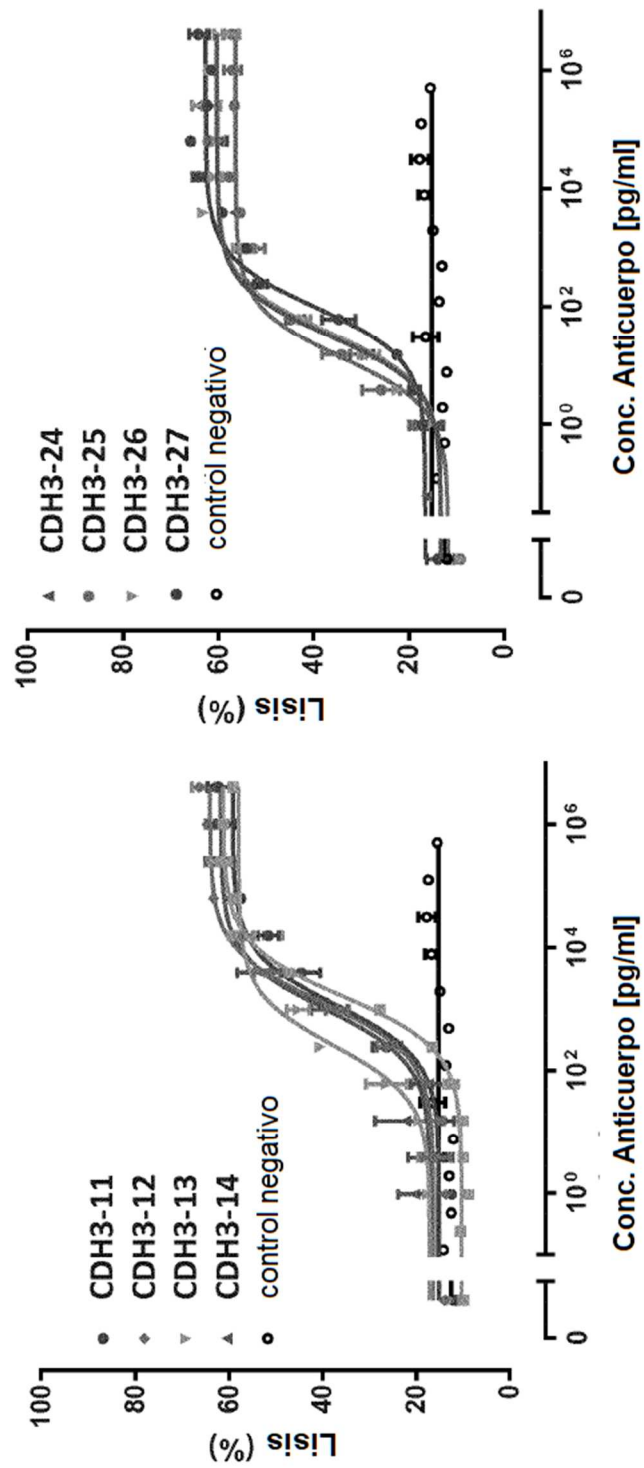


Figura 10B

Figura 10A

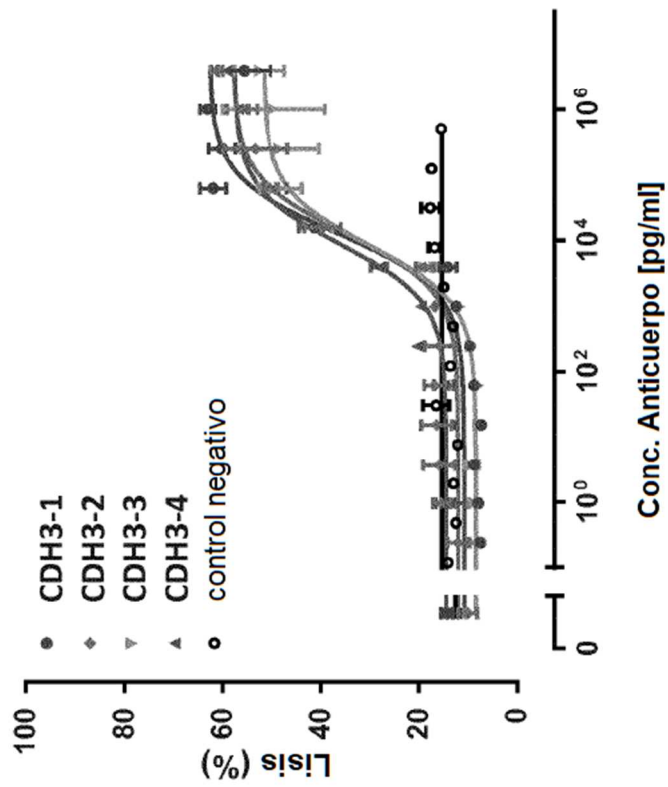


Figura 10C

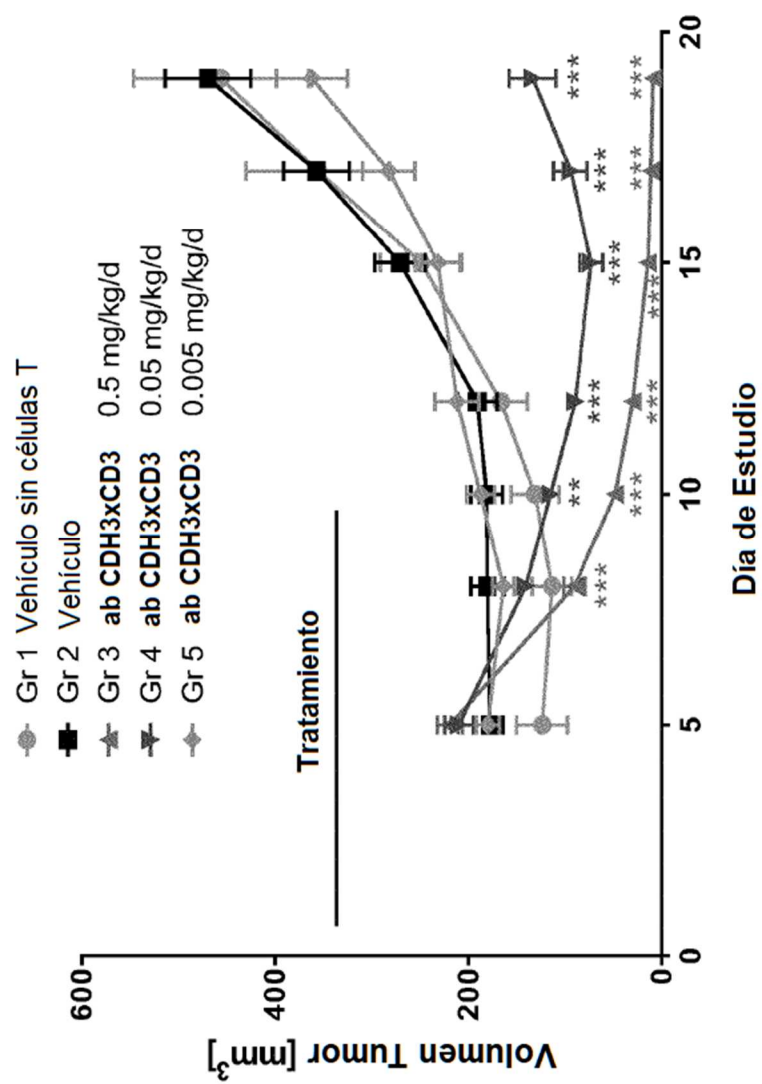


Figura 11

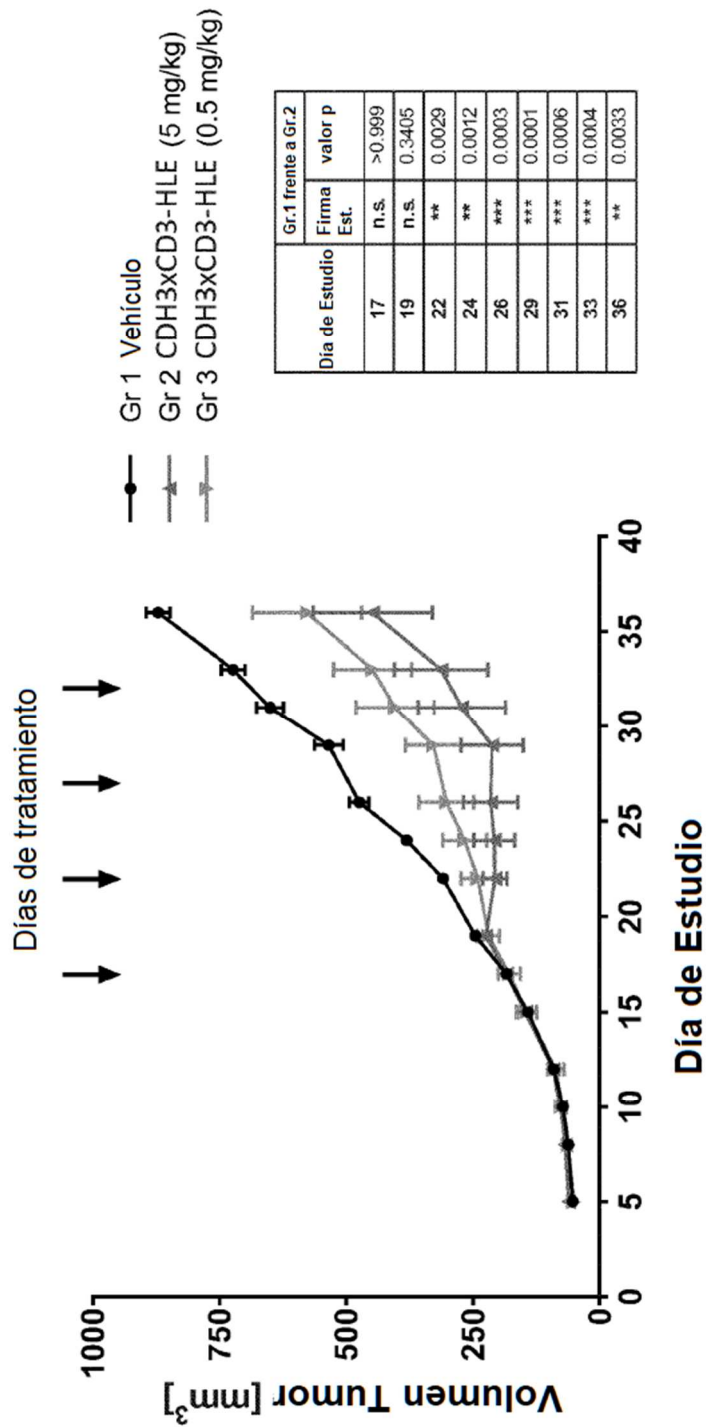


Figura 12A

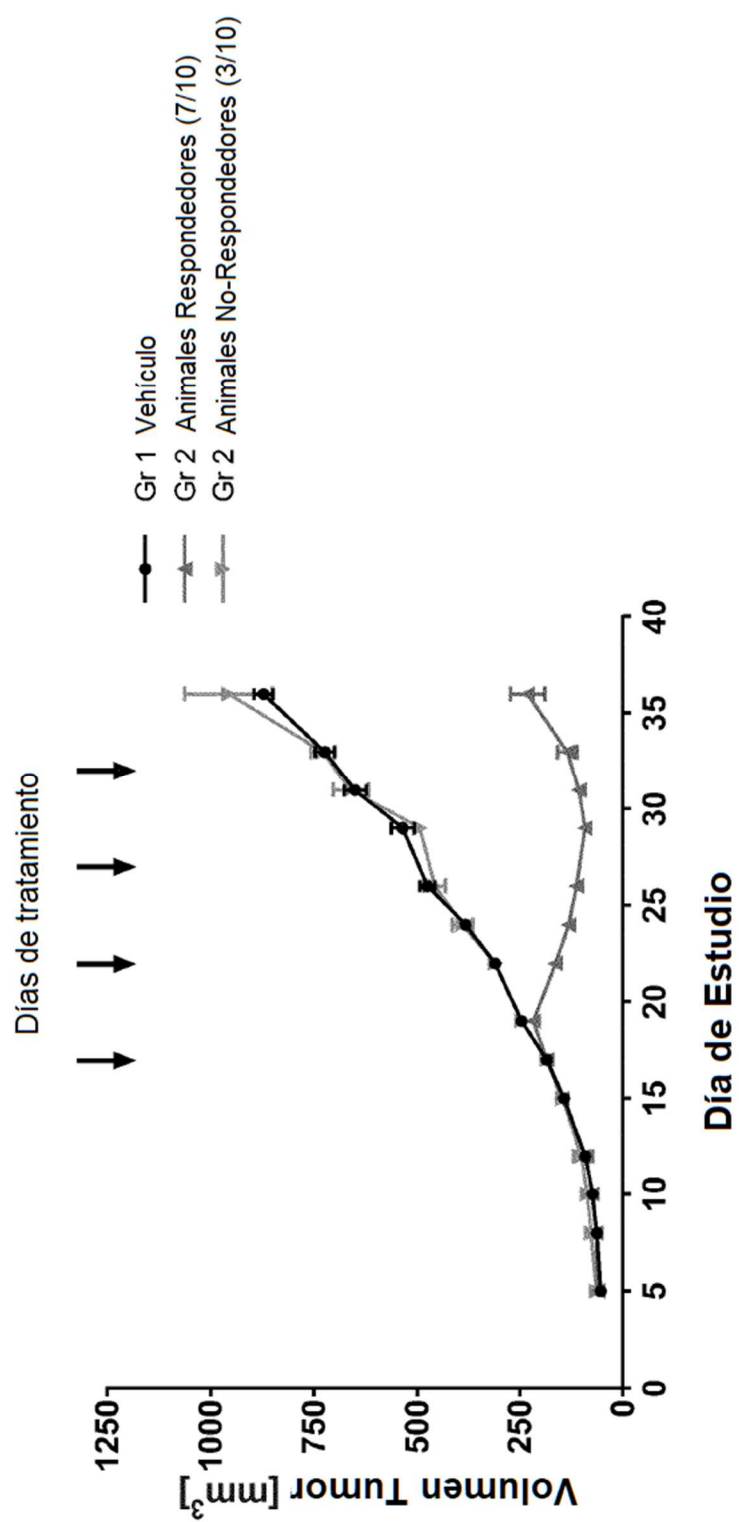


Figura 12B

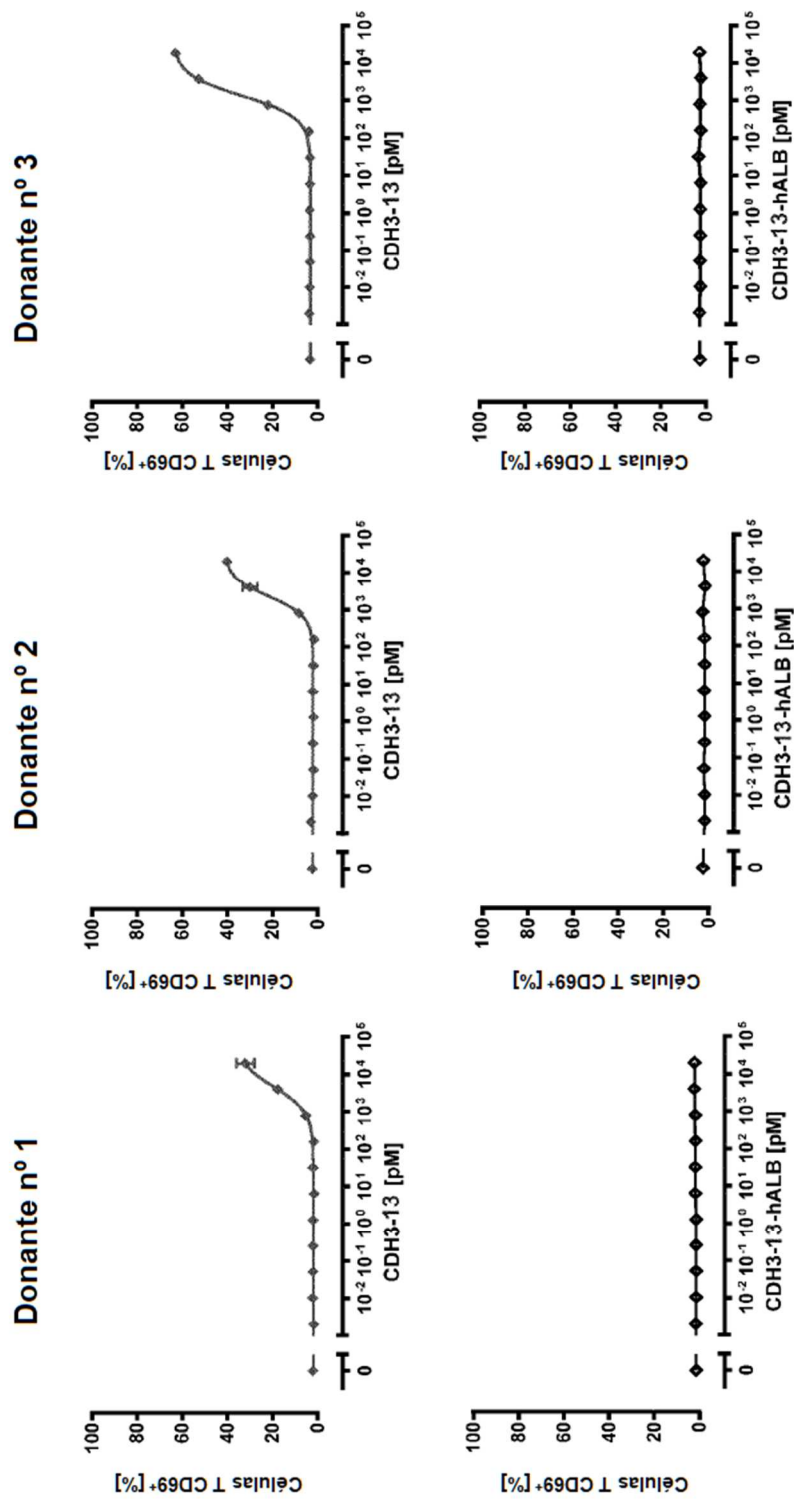


Figura 13