

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 998 140**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2019 PCT/EP2019/055946**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2019 WO19175071**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2019 E 19709056 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024 EP 3765489**

54 Título: **Combinación terapéutica de agonistas de 4-1BB con anticuerpos anti-CD20**

30 Prioridad:

**13.03.2018 EP 18161435**

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

**19.02.2025**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.00%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**FERRARA KOLLER, CLAUDIA;  
KLEIN, CHRISTIAN;  
SAM, JOHANNES;  
UMANA, PABLO y  
XU, WEI**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

Observaciones:

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

ES 2 998 140 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

Combinación terapéutica de agonistas de 4-1BB con anticuerpos anti-CD20

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a politerapias que emplean un agonista de 4-1BB (CD137) que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un antígeno asociado a tumor, en particular, una molécula de unión a antígeno 4-1BBL que selecciona como diana CD19, y a anticuerpos específicos que se unen a CD20 humano, al uso de estas politerapias para el tratamiento del cáncer y a procedimientos de uso de las politerapias.

**Antecedentes**

15 Los trastornos proliferativos de linfocitos B describen un grupo heterogéneo de neoplasias malignas que incluye tanto leucemias como linfomas. Los linfomas se desarrollan a partir de células linfáticas e incluyen dos categorías principales: linfomas de Hodgkin (LH) y linfomas no hodgkinianos (LNH). En los Estados Unidos, los linfomas de origen en linfocitos B constituyen aproximadamente un 80-85 % de todos los casos de linfomas no hodgkinianos, y existe una heterogeneidad considerable dentro del subconjunto de linfocitos B, basada en patrones de expresión genotípica y fenotípica en el linfocito B de origen. Por ejemplo, los subconjuntos de linfomas de linfocitos B incluyen las enfermedades de escasa malignidad e incurables de crecimiento lento, tales como linfoma folicular (LF) o leucemia linfocítica crónica (LLC), así como los subtipos más agresivos, linfoma de células del manto (LCM) y linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL). A pesar de la disponibilidad de diversos agentes para el tratamiento de trastornos proliferativos de linfocitos B, existe una necesidad continua de desarrollar tratamientos seguros y eficaces para prolongar la remisión y mejorar las tasas de curación en los pacientes.

Una estrategia que se está investigando actualmente es la interacción de los linfocitos T contra los linfocitos B malignos. Para hacer que los linfocitos T interaccionen eficazmente contra los linfocitos B malignos, se han desarrollado dos enfoques recientes. Estos dos enfoques son: 1) la administración de linfocitos T genomanipulados *ex vivo* para reconocer células tumorales (también conocido como tratamiento con linfocitos T modificados con receptor de antígeno quimérico o linfocitos CAR-T) (Maude *et al.*, N Engl J Med (2014) 371, 1507-1517); y 2) la administración de agentes que activan linfocitos T endógenos, tales como anticuerpos biespecíficos (Oak y Bartlett, Expert Opin Investig Drugs (2015) 24, 715-724). Se informa de un ejemplo del primer enfoque en el estudio por Maude *et al.*, en el que se trataron 30 pacientes adultos y pediátricos con linfocitos T autólogos transducidos con un vector lentivírico con receptor de antígeno quimérico dirigido a CD19 (linfocitos CAR-T para CTL019). El resultado fue una remisión mantenida basada en una tasa de supervivencia sin sucesos en 6 meses de un 67 % y una tasa de supervivencia global de un 78 %. Sin embargo, todos los pacientes tuvieron el síndrome de liberación de citocinas (SLC) (asociado con la carga tumoral), teniendo un 27 % de los pacientes SLC grave. También se observaron toxicidades del sistema nervioso central de causa desconocida a frecuencias altas. El segundo enfoque, que implica activar los linfocitos T endógenos para reconocer dianas tumorales, elude este obstáculo de escalabilidad y también puede proporcionar eficacia competitiva, datos de seguridad y duraciones de respuesta potencialmente a largo plazo. En diferentes neoplasias malignas hemáticas CD20<sup>+</sup>, este enfoque se ejemplifica mejor por blinatumomab, una molécula biespecífica de linfocitos T que selecciona como diana CD19-CD3 (Bargou *et al.*, Science (2008) 321, 974-977) que se aprobó recientemente para pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) positiva para enfermedad residual mínima. Este compuesto, que está compuesto por dos fragmentos Fv monocatenarios (el llamado formato BiTE®), dirige la lisis de células CD19<sup>+</sup> por linfocitos T citotóxicos. La principal limitación de blinatumomab es su semivida corta (de aproximadamente 2 horas), lo que necesita una infusión continua por medio de una bomba durante 4-8 semanas. Además, también se ha observado con frecuencia SLC grave y toxicidad para el SNC (Klinger *et al.*, Blood. 2012; 119(26):6226-6233). En pacientes que recibieron blinatumomab en todos los ensayos clínicos, se han producido toxicidades neurológicas aproximadamente en un 50 % de los pacientes y los tipos de toxicidades observados están bien definidos en el prospecto del envase.

4-1BB (CD137), un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, se identificó, en primer lugar, como una molécula inducible expresada por linfocitos T activados (Kwon y Weissman, Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86, 1963-1967). Los estudios posteriores demostraron que muchas otras células inmunitarias también expresan 4-1BB, incluyendo los linfocitos NK, linfocitos B, linfocitos NKT, monocitos, neutrófilos, mastocitos, células dendríticas (CD) y células de origen no hematopoyético, tales como células endoteliales y células musculares lisas (Vinay y Kwon, Cell Mol Immunol. (2011) 8, 281-284). La expresión de 4-1BB en diferentes tipos de células es, en su mayor parte, inducible y está impulsada por diversas señales estimuladoras, tales como la activación del receptor de linfocitos T (TCR) o del receptor de linfocitos B, así como la señalización inducida a través de moléculas coestimuladoras o receptores de citocinas proinflamatorias (Diehl *et al.*, J Immunol (2002) 168, 3755-3762; Zhang *et al.*, J Immunol (2010) 184, 787-795).

65 El ligando para 4-1BB (4-1BBL o CD137L) se identificó en 1993 (Goodwin *et al.*, Eur J Immunol. (1993) 23, 2631-2641). Se ha demostrado que la expresión de 4-1BBL estaba restringida en células presentadoras de

antígenos (APC) profesionales, tales como linfocitos B, CD y macrófagos. La expresión inducible de 4-1BBL es característica de los linfocitos T, incluyendo subconjuntos de linfocitos T tanto  $\alpha\beta$  como  $\gamma\delta$ , y células endoteliales (Shao y Schwarz, *J Leukoc Biol* (2011) 89, 21-29).

5 La coestimulación a través del receptor de 4-1BB (por ejemplo, por fijación de 4-1BBL) activa múltiples cascadas de señalización dentro del linfocito T (subconjuntos tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>), aumentando poderosamente la activación de linfocitos T (Bartkowiak y Curran, *Front Oncol* (2015) 5, 117). En combinación con la activación del TCR, los anticuerpos específicos de 4-1BB agonistas potencian la proliferación de linfocitos T, estimulan la secreción de linfocinas y disminuyen la sensibilidad de los linfocitos T a la muerte celular inducida por activación  
10 (Snell *et al.*, *Immunol Rev* (2011) 244, 197-217). Este mecanismo se avanzó además como la primera prueba de concepto en inmunoterapia contra el cáncer. En un modelo preclínico, la administración de un anticuerpo agonista contra 4-1BB en ratones que portaban tumores dio lugar a un potente efecto antitumoral (Melero *et al.*, *Nature Med* (1997) 3, 682-685). Más tarde, las pruebas acumuladas indicaron que 4-1BB normalmente presenta su potencia como agente antitumoral solo cuando se administra en combinación con otros compuestos inmunomoduladores, reactivos quimioterápicos, vacunación específica para tumores o radioterapia (Bartkowiak y Curran, *Front Oncol* (2015) 5, 117).

La señalización de la superfamilia de TNFR necesita la reticulación de los ligandos trimerizados para que interactúen con los receptores, al igual que los anticuerpos agonistas de 4-1BB que requieren unión a Fc natural (Li y Ravetch, *Science* (2011) 333, 1030-1034). Sin embargo, la administración sistémica de anticuerpos agonistas específicos de 4-1BB con el dominio Fc funcionalmente activo dio como resultado una afluencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> asociados con toxicidad hepática (Dubrot *et al.*, *Cancer Immunol Immunother* (2010) 59, 1223-1233) que disminuye o mejora significativamente en ausencia de receptores de Fc funcionales en ratones. En la práctica clínica, un Ab agonista de 4-1BB competente con respecto a Fc (BMS-663513) (NCT00612664) provocó una hepatitis de grado 4 que dio lugar a la finalización del ensayo (Simeone y Ascierto, *J Immunotoxicol* (2012) 9, 241-247). Por lo tanto, existe una necesidad de obtener agonistas de 4-1BB eficaces y más seguros.

Se han preparado proteínas de fusión compuestas por un dominio extracelular de un ligando para 4-1BB y un fragmento de anticuerpo monocatenario (Hornig *et al.*, *J Immunother* (2012) 35, 418-429; Müller *et al.*, *J Immunother.* (2008) 31, 714-722) o un único ligando para 4-1BB fusionado al extremo C de una cadena pesada (Zhang *et al.*, *Clin Cancer Res* (2007) 13, 2758-2767). Liu *et al.*, *J. Immunother.* 2010, 33, 500-509, divulgan una proteína de fusión ligando para 4-1BB/anti-CD20 y su combinación con un anticuerpo anti-CD3/anti-CD20. El documento WO 2010/010051 divulga la generación de proteínas de fusión que consisten en tres ectodominios de ligandos para TNF enlazados entre sí y fusionados a una parte de anticuerpo. En la presente invención, se demuestra que las moléculas de unión a antígeno compuestas por un ligando para 4-1BB trimérico y, por tanto, biológicamente activo, y un dominio de unión a antígeno específico para el antígeno tumoral CD19 y una región Fc carente de unión a Fc $\gamma$ R, son, en particular, estables y sólidas (nombradas en el presente documento CD19-4-1BBL). Estas construcciones se divulgan en el documento WO 2016/075278 y reemplazan la reticulación mediada por Fc $\gamma$ R inespecífica responsable de la toxicidad mediada por Fc por una reticulación específica de linfocito B que selecciona como diana CD19.

CD19 es una diana ideal para inmunoterapia de neoplasias malignas de linfocitos B, ya que se expresa en la superficie de los linfocitos B y es casi específico de estas células. CD19 se expresa más ampliamente que CD20 en los linfocitos B durante el desarrollo de los linfocitos B, por lo que típicamente una célula positiva para CD20 también expresará CD19. Durante la diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas (células secretoras de anticuerpos), los linfocitos B regulan por disminución la expresión de CD20. A veces, los linfomas de linfocitos B también regulan por disminución la expresión de CD20, pero siguen siendo positivos para CD19. Por lo tanto, la selección como diana tanto de CD19 como de CD20 cubriría ampliamente los linfocitos B patológicos en los linfomas, lo que también podría desviar la presión de selección de CD20 a tanto CD19 como a CD20. Aunque no se sabe si CD19 contribuye directamente a la carcinogénesis de los linfocitos B, su expresión está altamente conservada en la mayoría de los tumores de linfocitos B, tales como leucemias linfoblásticas agudas (LLA), leucemias linfocíticas crónicas (LLC) y linfomas de linfocitos B. En las leucemias agudas, CD19 se expresa constante y continuamente en casi todos los subtipos, mientras que solo un pequeño número de leucemias expresan CD20.

El uso de rituximab y obinutuzumab, que son anticuerpos anti-CD20, en el tratamiento del trastorno proliferativo de linfocitos B se ha descrito, por ejemplo, en: Robert (2017), *NEJM* 377(14):1331-1344; y en Karmali (2018), *Annals Onc.* 29(2):332-340.

Por tanto, todavía existe una necesidad de obtener nuevos compuestos y combinaciones que tengan el potencial de contribuir significativamente al tratamiento de pacientes con trastornos proliferativos de linfocitos B, tales como LNH y LLC. Se ha descubierto que se logra un excelente efecto antitumoral cuando la molécula de unión a antígeno 4-1BBL que selecciona como diana CD19 se combina con anticuerpos específicos que se unen al CD20 humano. Por tanto, en el presente documento se describe una novedosa politerapia para el cáncer con neoplasia maligna de linfocitos B.

**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un agonista de 4-1BB (CD137) que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19, en particular, una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodominios de 4-1BBL, y a su uso en combinación y de forma concomitante con anticuerpos que se unen a CD20 humano, en particular, rituximab u obinutuzumab, en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, más en particular para tratar o retrasar la progresión de trastornos proliferativos de linfocitos B. Se ha descubierto que la politerapia descrita en el presente documento es más eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral y eliminación de las células tumorales que el tratamiento con anticuerpos anti-CD20 en solitario.

En un aspecto, la invención proporciona un agonista de 4-1BB (CD137) para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno proliferativo de linfocitos B, en la que el agonista de 4-1BB se usa en combinación con un anticuerpo anti-CD20 seleccionado de rituximab u obinutuzumab,

en la que:

(a) dicho trastorno proliferativo de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en linfoma no hodgkiniano (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de la zona marginal (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH); y

(b) dicho agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende

(i) un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19,

(ii) un primer y un segundo polipéptido que están enlazados entre sí por un enlace disulfuro, y

(iii) un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración EU); y

(c) dicho primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 que están conectados entre sí por un conector peptídico y dicho segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, el agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 y el anticuerpo anti-CD20 se administran juntos en una única composición o se administran por separado en dos composiciones diferentes.

En un aspecto, los ectodominios de 4-1BBL comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5. Más en particular, los ectodominios de 4-1BBL comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

En un aspecto, el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende

(a) una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ CD19) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y una región variable de la cadena ligera ( $V_L$ CD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, o

(b) una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ CD19) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y una región variable de la cadena ligera ( $V_L$ CD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

En un aspecto particular, el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera ( $V_L$ CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera ( $V_L$ CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. En un aspecto particular, el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una

región variable de la cadena pesada ( $V_H$ CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera ( $V_L$ CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

5 En un aspecto particular, se proporciona el agonista de 4-1BB para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno proliferativo de linfocitos B seleccionado del grupo que consiste en linfoma no hodgkiniano (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de la zona marginal (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH) en combinación con un anticuerpo anti-CD20, en el que el agonista de 4-1BB es  
10 una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

15 En otro aspecto, se proporciona el agonista de 4-1BB para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno proliferativo de linfocitos B seleccionado del grupo que consiste en linfoma no hodgkiniano (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de la zona marginal (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH) en combinación con un anticuerpo anti-CD20 como se define anteriormente en el presente  
20 documento, en el que la combinación se administra de forma concomitante a intervalos de aproximadamente una semana a tres semanas.

En otro aspecto, se proporciona el agonista de 4-1BB para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno proliferativo de linfocitos B seleccionado del grupo que consiste en linfoma no hodgkiniano (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de la zona marginal (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH) en combinación con un anticuerpo anti-CD20, en el que se realiza un pretratamiento con  
25 un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferentemente obinutuzumab, antes de la politerapia, en el que el periodo de tiempo entre el pretratamiento y la politerapia es suficiente para la reducción de los linfocitos B en el individuo en respuesta al anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferentemente obinutuzumab.  
30

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el agonista de 4-1BB como se define anteriormente en el presente documento y un anticuerpo anti-CD20 seleccionado de rituximab u obinutuzumab, en la que el agonista de 4-1BB y el anticuerpo anti-CD20 se administran juntos en una única  
35 composición. En particular, la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento de trastornos proliferativos de linfocitos B, en particular, una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en linfoma no hodgkiniano (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de la zona marginal (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH).  
40

### Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** muestra moléculas de unión a antígeno CD19-4-1BBL particulares como se usa en los ejemplos. Estas moléculas se describen con más detalle en los ejemplos 1 y 2, respectivamente. El punto negro grueso representa  
45 la modificación de botón en ojal. La figura 1A muestra una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero CD19 4-1BBL monovalente con modificaciones aminoacídicas en el dominio CH1 y CL contiguo al dímero 4-1BBL y al monómero 4-1BBL. Como comprendía la proteína de unión para CD19, 8B8-018, en el presente documento se nombró CD19(018)-4-1BBL mono. La construcción mostrada en la figura 1B difiere de la 1A en que comprende la proteína de unión para CD19, 8B8-2B11, y, por tanto, se denominó CD19(2B11)-4-1BBL mono. La figura 1D muestra la construcción bivalente con la proteína de unión para CD19(018), denominada CD19(018)-4-1BBL bi. Las figuras 1C y 1E muestran moléculas de control no seleccionadas como diana (la proteína de unión para CD19 se ha reemplazado por un Fab de DP47 que no se une). La figura 1F muestra una molécula de unión a antígeno que contiene un trímero CD19 4-1BBL monovalente que comprende un dímero 4-1BBL murino y un monómero 4-1BBL murino, denominada en el presente documento CD19-4-1BBL o CD19-mu4-1BBL híbrida.  
50

La **figura 2A** ilustra la configuración del ensayo que mide la unión simultánea de 4-1BBL dividido trimérico que selecciona como diana CD19 a 4-1BB murino y CD19 humano (ejemplo 2). El gráfico en la **figura 2B** muestra la unión simultánea del sustituto híbrido CD19-mu4-1BBL (analito 1) a 4-1BB murino inmovilizado y CD19 humano (analito 2).  
55

En las **figuras de 3A a 3C** se demuestra que CD19-4-1BBL pudo promover la activación de linfocitos NK (liberación de IFN $\gamma$ ) que se activaron por rituximab u obinutuzumab (Gazyva) al interactuar con líneas celulares de LNH, es decir, con WSU-DLCL2 (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>alta</sup>) (**fig. 3A**), SU-DHL-8 (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>baja</sup>) (**fig. 3B**) o Naml-6 (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>baja</sup>) (**fig. 3C**).  
60

Las **figuras de 4A a 4C** muestran que al combinar CD19-4-1BBL con rituximab u obinutuzumab (Gazyva), se  
65

promueve la activación de linfocitos NK (regulación por incremento de CD25) al interactuar con líneas celulares de LNH, es decir, con WSU-DLCL2 (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>alta</sup>) (**fig. 4A**), SU-DHL-8 (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>baja</sup>) (**fig. 4B**) o Naml-6 (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>baja</sup>) (**fig. 4C**).

5 En las **figuras de 5A a 5C** se demuestra que la combinación de CD19-4-1BBL y obinutuzumab (Gazyva) promueve la activación de linfocitos NK (regulación por incremento de CD25) al interactuar con las líneas celulares de LNH WSU-DLCL2 (**fig. 5A**), SU-DHL-8 (**fig. 5B**) o Naml-6 (**fig. 5C**), mientras que la combinación de urelumab con obinutuzumab no lo hace.

10 La **figura 6** muestra el protocolo del estudio de eficacia *in vivo* de la molécula CD19-4-1BBL híbrida monovalente (CD19-mu4-1BBL mono) en combinación con rituximab en ratones Scid huCD16Tg. En la tabla a continuación se definen los subgrupos de ratones que recibieron diferentes combinaciones y dosis. El experimento se describe en el ejemplo 4 y los resultados se muestran en las **figuras 7A y 7B**. La combinación de CD19-mu4-1BBL mono en combinación con rituximab indujo una inhibición del crecimiento tumoral más fuerte y más rápida en comparación con la monoterapia con rituximab o la monoterapia con CD19-mu4-1BBL mono en todas las dosis sometidas a prueba. Como se muestra en la **figura 7B**, los pesos tumorales al finalizar el estudio confirmaron estos hallazgos.

15 La **figura 8** muestra el protocolo del estudio de eficacia *in vivo* de la construcción CD19 (2B11)-4-1BBL monovalente en combinación con obinutuzumab (Gazyva) en ratones NSG completamente humanizados que portan WSU-DLCL2. En la tabla a continuación se definen los subgrupos de ratones que recibieron diferentes combinaciones y dosis. El experimento se describe en el ejemplo 5 y los resultados se muestran en la **figura 9**. La combinación de CD19 (2B11)-4-1BBL mono con Gazyva indujo una inhibición del crecimiento tumoral mucho más fuerte en comparación con la monoterapia con Gazyva.

## 25 Descripción detallada

La divulgación técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de las reivindicaciones. Los elementos de la divulgación que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan a título informativo.

## 30 Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se usa en general en la técnica a la que la presente invención pertenece. Para los propósitos de interpretación de la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando se apropiado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa.

40 Como se usa en el presente documento, el término "**molécula de unión a antígeno**" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Los ejemplos de moléculas de unión a antígeno son anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y proteínas de unión a antígeno de andamio.

45 El término "**anticuerpo**" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos y multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

50 El término "**anticuerpo monoclonal**" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes en general dichas variantes en cantidades escasas. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno.

55 El término anticuerpo "**monoespecífico**" como se usa en el presente documento indica un anticuerpo que tiene uno o más sitios de unión de los que cada uno se une al mismo epítipo del mismo antígeno. El término "**biespecífica**" quiere decir que la molécula de unión a antígeno se puede unir específicamente a al menos dos determinantes antigénicos distintos. Típicamente, una molécula de unión a antígeno biespecífica comprende dos sitios de unión a antígeno, de los que cada uno es específico para un determinante antigénico diferente. En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica se puede unir simultáneamente a dos determinantes antigénicos, en particular dos determinantes antigénicos expresados en dos células distintas.

60 El término "**valente**" como se usa en la solicitud actual indica la presencia de un número específico de sitios de unión en una molécula de unión a antígeno. Como tales, los términos "bivalente", "tetravalente" y "hexavalente" indican la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente, en una

molécula de unión a antígeno. "Monovalente" indica la presencia de solo un dominio de unión para una diana particular en la molécula de unión a antígeno.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural. "**Anticuerpos naturales**" se refiere a moléculas de inmunoglobulina naturales con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos de clase IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dáltones, compuestas por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que se unen con disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también llamados región constante de la cadena pesada. De forma similar, del extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio constante de la cadena ligera (CL), también llamado región constante de la cadena ligera. La cadena pesada de un anticuerpo se puede asignar a uno de cinco tipos, llamados  $\alpha$  (IgA),  $\delta$  (IgD),  $\epsilon$  (IgE),  $\gamma$  (IgG) o  $\mu$  (IgM), de los que algunos se pueden dividir además en subtipos, por ejemplo,  $\gamma 1$  (IgG1),  $\gamma 2$  (IgG2),  $\gamma 3$  (IgG3),  $\gamma 4$  (IgG4),  $\alpha 1$  (IgA1) y  $\alpha 2$  (IgA2). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

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

La digestión con papaína de anticuerpos intactos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab" que contienen cada uno los dominios variables de la cadena pesada y ligera y también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Por tanto, como se usa en el presente documento, un "**fragmento Fab**" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un fragmento de cadena ligera que comprende un dominio VL y un dominio constante de una cadena ligera (CL), y un dominio VH y un primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH son fragmentos Fab' en los que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes contiene(n) un grupo tiol libre. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación de antígeno (dos fragmentos Fab) y una parte de la región Fc.

El término "**fragmento cross-Fab**" o "fragmento xFab" o "fragmento Fab de entrecruzamiento" se refiere a un fragmento Fab, en el que las regiones variables o bien las regiones constantes de la cadena pesada y ligera se intercambian. Son posibles dos composiciones de cadena diferentes de una molécula Fab de entrecruzamiento y están comprendidas en los anticuerpos biespecíficos: Por una parte, las regiones variables de la cadena pesada y ligera de Fab se intercambian, es decir, la molécula Fab de entrecruzamiento comprende una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena ligera (VL) y la región constante de la cadena pesada (CH1), y una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena pesada (VH) y la región constante de la cadena ligera (CL). Esta molécula Fab de entrecruzamiento también se denomina CrossFab<sub>(VLVH)</sub>. Por otra parte, cuando las regiones constantes de la cadena pesada y ligera de Fab se intercambian, la molécula Fab de entrecruzamiento comprende una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena pesada (VH) y la región constante de la cadena ligera (CL), y una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena ligera (VL) y la región constante de la cadena pesada (CH1). Esta molécula Fab de entrecruzamiento también se denomina CrossFab<sub>(CLCH1)</sub>.

Un "fragmento Fab monocatenario" o "**scFab**" es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) de anticuerpo, un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, un dominio variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) de anticuerpo, un dominio constante de la cadena ligera (CL) de anticuerpo y un conector, en el que dichos dominios de anticuerpo y dicho conector tienen uno de los siguientes órdenes en sentido de N terminal a C terminal: a) VH-CH1-conector-VL-CL, b) VL-CL-conector-VH-CH1, c) VH-CL-conector-VL-CH1 o d) VL-CH1-conector-VH-CL; y en el que dicho conector es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos, preferentemente de entre 32 y 50 aminoácidos. Dichos fragmentos Fab monocatenarios se estabilizan por medio del enlace disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1. Además, estas moléculas Fab monocatenarias se podrían estabilizar además por generación de enlaces disulfuro intercatenarios por medio de la inserción de residuos de cisteína (por ejemplo, la posición 44 en la cadena pesada variable y la posición 100 en la cadena ligera variable de acuerdo con la numeración de Kabat).

Un "fragmento Fab monocatenario de entrecruzamiento" o "**x-scFab**" es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) de anticuerpo, un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, un dominio variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) de anticuerpo, un dominio constante de la cadena ligera (CL) de anticuerpo y un conector, en el que dichos dominios de anticuerpo y dicho conector tienen uno de los siguientes órdenes en sentido de N terminal a C terminal: a) VH-CL-conector-VL-CH1 y b) VL-CH1-conector-VH-CL; en el que VH y VL forman juntos un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno y en el que dicho conector es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos. Además, estas moléculas x-scFab se podrían estabilizar además por generación de enlaces disulfuro intercatenarios por medio de la inserción de residuos de cisteína (por ejemplo, la posición 44 en la cadena pesada variable y la posición 100 en la cadena ligera variable de acuerdo con la numeración de Kabat).

Un "**fragmento variable monocatenario (scFv)**" es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (V<sub>H</sub>) y ligera (V<sub>L</sub>) de un anticuerpo, conectada con un péptido conector corto de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. El conector es normalmente rico en glicina para aportar flexibilidad, así como en serina o treonina para aportar solubilidad, y puede conectar el extremo N de V<sub>H</sub> con el extremo C de V<sub>L</sub> o bien viceversa. Esta proteína retiene la especificidad del anticuerpo original, a pesar de la retirada de las regiones constantes y la introducción del conector. Los anticuerpos scFv se describen, por ejemplo, en Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96). Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos monocatenarios que tienen las características de un dominio VH, a saber, que se pueden ensamblar conjuntamente con un dominio VL, o de un dominio VL, a saber, que se pueden ensamblar conjuntamente con un dominio VH a un sitio de unión a antígeno funcional y proporcionar de este modo la propiedad de unión a antígeno de los anticuerpos de longitud completa.

Las "**proteínas de unión a antígeno de andamio**" son conocidas en la técnica, por ejemplo, la fibronectina y proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas (DARPin) se han usado como andamios alternativos para los dominios de unión a antígeno, véase, por ejemplo, Gebauer y Skerra, *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics.* *Curr Opin Chem Biol* 13:245-255 (2009) y Stumpp *et al.*, *Darpins: A new generation of protein therapeutics.* *Drug Discovery Today* 13: 695-701 (2008). En un aspecto, una proteína de unión a antígeno de andamio se selecciona del grupo que consiste en CTLA-4 (Evibody), lipocalinas (anticalina), una molécula derivada de proteína A tal como dominio Z de proteína A (Affibody), un dominio A (Avimer/Maxibody), una transferrina sérica (*trans*-cuerpo); una proteína con repeticiones de anquirina diseñada (DARPin), un dominio variable de la cadena ligera o cadena pesada de anticuerpo (anticuerpo de dominio único, sdAb), un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (nanocuerpo, aVH), fragmentos V<sub>NAR</sub>, una fibronectina (AdNectin), un dominio de lectina de tipo C (tetranectina); un dominio variable de un nuevo receptor de antígeno de beta-lactamasa (fragmentos V<sub>NAR</sub>), una ubicuitina o cristalina gamma humana (moléculas de Affilin); un dominio de tipo kunitz de inhibidores de proteasas humanas, microcuerpos, tales como las proteínas de la familia knottin, aptámeros peptídicos y fibronectina (adnectina).

Las lipocalinas son una familia de proteínas extracelulares que transportan moléculas hidrófobas pequeñas tales como esteroides, bilinas, retinoides y lípidos. Tienen una estructura secundaria de lámina beta rígida con un número de bucles en el extremo abierto de la estructura cónica que se pueden genomanipular para unirse a diferentes antígenos diana. Las anticalinas tienen entre 160-180 aminoácidos de tamaño, y se derivan de lipocalinas. Para detalles adicionales, véanse *Biochim Biophys Acta* 1482: 337-350 (2000), documentos US7250297B1 y US20070224633.

Las proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas (DARPin) se derivan de anquirina que es una familia de proteínas que median en la fijación de proteínas de membrana integrales al citoesqueleto. Una repetición de anquirina individual es un motivo de 33 residuos que consiste en dos hélices alfa y una vuelta beta. Se pueden genomanipular para unirse a diferentes antígenos diana aleatorizando residuos en la primera hélice alfa y una vuelta beta de cada repetición. Su interfase de unión se puede incrementar incrementando el número de módulos (un procedimiento de maduración en afinidad). Para detalles adicionales, véanse *J. Mol. Biol.* 332, 489-503 (2003), *PNAS* 100(4), 1700-1705 (2003) y *J. Mol. Biol.* 369, 1015-1028 (2007) y el documento US20040132028A1.

Un anticuerpo de dominio único es un fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio de anticuerpo variable monomérico único. Los primeros dominios únicos se derivaron del dominio variable de la cadena pesada de

anticuerpo de camélidos (nanocuerpos o fragmentos V<sub>H</sub>H). Además, el término anticuerpo de dominio único incluye un dominio variable de la cadena pesada humano autónomo (aVH) o fragmentos V<sub>NAR</sub> derivados de tiburones.

5 Una "**molécula de unión a antígeno que se une al mismo epítipo**" como molécula de referencia se refiere a una molécula de unión a antígeno que bloquea la unión de la molécula de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más, y a la inversa, la molécula de referencia bloquea la unión de la molécula de unión a antígeno a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más.

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

15 Como se usa en el presente documento, el término "**determinante antigénico**" es sinónimo de "antígeno" y "epítipo" y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional constituida por diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une un resto de unión a antígeno, formando un complejo de resto de unión a antígeno-antígeno. Los determinantes antigénicos útiles se pueden encontrar, por ejemplo, en las superficies de células tumorales, en las superficies de células infectadas por virus, en las superficies de otras células patológicas, en la superficie de células inmunitarias, libres en suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (MEC). Las proteínas útiles como antígenos en el presente documento pueden ser cualquier forma natural de las proteínas de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. En un modo de realización particular, el antígeno es una proteína humana. Cuando se hace referencia a una proteína específica en el presente documento, el término engloba la proteína no procesada "de longitud completa", así como cualquier forma de la proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de la proteína, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas.

20 Con "**unión específica**" se quiere decir que la unión es selectiva para el antígeno y se puede discriminar de las interacciones no deseadas o inespecíficas. La capacidad de una molécula de unión a antígeno de unirse a un antígeno específico se puede medir a través de un ensayo de inmuoadsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas conocidas para un experto en la técnica, por ejemplo, técnica de resonancia de plasmón superficial (RPS) (analizado en un instrumento de BIACore) (Liljeblad *et al.*, Glyco J 17, 323-329 (2000)), y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En un modo de realización, el grado de unión de una molécula de unión a antígeno a una proteína no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión de la molécula de unión a antígeno al antígeno como se mide, por ejemplo, por RPS. En determinados modos de realización, una molécula que se une al antígeno tiene una constante de disociación (K<sub>d</sub>) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,01 \text{ nM}$  o  $\leq 0,001 \text{ nM}$  (por ejemplo,  $10^{-8} \text{ M}$  o menos, por ejemplo, de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo, de  $10^{-9} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ ).

25 "**Afinidad**" o "afinidad de unión" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y, en general, se puede representar por la constante de disociación (K<sub>d</sub>), que es la proporción de las constantes de velocidad de disociación y asociación (k<sub>d</sub> y k<sub>a</sub>, respectivamente). Por tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre que la proporción de las constantes de velocidad permanezca igual. La afinidad se puede medir por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Un procedimiento particular para medir la afinidad es la resonancia de plasmón superficial (RPS).

30 Un "**antígeno para linfocito B**" como se usa en el presente documento se refiere a un determinante antigénico presentado en la superficie de un linfocito B, en particular, un linfocito B maligno (en ese caso, el antígeno también se denomina "antígeno para linfocito B maligno").

35 El término "**antígeno asociado a tumor**" quiere decir cualquier antígeno que se exprese altamente por células tumorales o en el estroma tumoral. Un antígeno asociado a tumor particular es CD19.

40 El término "**CD19**" se refiere al antígeno de linfocitos B CD19, también conocido como antígeno de superficie de linfocitos B B4 o antígeno de superficie de linfocitos T Leu-12, e incluye cualquier CD19 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, macacos cangrejeros) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. La secuencia de aminoácidos de CD19 humano se muestra en el n.º de acceso a Uniprot P15391 (versión

160, SEQ ID NO: 62). El término engloba el CD19 humano no procesado de "longitud completa", así como cualquier forma de CD19 humano que resulte del procesamiento en la célula siempre que el anticuerpo como se informa en el presente documento se una al mismo. CD19 es un receptor de superficie celular estructuralmente distinto, expresado en la superficie de los linfocitos B humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, prelinfocitos B, linfocitos B en desarrollo temprano (es decir, linfocitos B inmaduros), linfocitos B maduros a través de la diferenciación terminal en células plasmáticas y linfocitos B malignos. CD19 se expresa en la mayoría de las leucemias linfoblásticas agudas (LLA), linfomas no hodgkinianos, leucemias linfocíticas crónicas (LLC) de linfocitos B, leucemias prolinfocíticas, tricoleucemias, leucemias linfocíticas agudas comunes y algunas leucemias linfoblásticas agudas de linfocitos nulos. La expresión de CD19 en células plasmáticas sugiere además que se puede expresar en tumores de linfocitos B diferenciados, tales como el mieloma múltiple. Por lo tanto, el antígeno CD19 es una diana para inmunoterapia en el tratamiento de linfoma no hodgkiniano, leucemia linfocítica crónica y/o leucemia linfoblástica aguda.

"CD20" se refiere al antígeno de linfocitos B CD20, también conocido como antígeno de superficie de linfocitos B B1 o antígeno de superficie de leucocitos Leu-16, e incluye cualquier CD20 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates, (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, macacos cangrejeros) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. La secuencia de aminoácidos de CD20 humano se muestra en el n.º de acceso a Uniprot P1 1836 (versión 149, SEQ ID NO: 63). CD20 es una proteína transmembranaria hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD expresada en linfocitos pre-B y B maduros. El gen humano correspondiente es el miembro 1, subfamilia A, de 4 dominios que abarcan la membrana, también conocido como MS4A1. Este gen codifica un miembro de la familia de genes 4A que abarcan la membrana. Los miembros de esta familia de proteínas nacientes se caracterizan por rasgos característicos estructurales comunes y límites de empalme entre intrones/exones similares y presentan patrones de expresión únicos entre células hematopoyéticas y tejidos no linfáticos. Este gen codifica la molécula de superficie de linfocitos B que desempeña un papel en el desarrollo y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas. Este miembro de la familia se localiza en 11q12, entre un grupo de miembros de la familia. El empalme alternativo de este gen da como resultado dos variantes de transcripción que codifican la misma proteína. El término "CD20" engloba el CD20 no procesado "de longitud completa", así como cualquier forma de CD20 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de CD20, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas.

Los términos "anticuerpo anti-CD20" y "un anticuerpo que se une a CD20" se refieren a un anticuerpo que se puede unir a CD20 con suficiente afinidad, de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al seleccionar como diana CD20. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-CD20 a una proteína distinta de CD20 no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a CD20 como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoanálisis (RIA). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une a CD20 tiene una constante de disociación (Kd) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,01 \text{ nM}$  o  $\leq 0,001 \text{ nM}$  (por ejemplo, de  $10^{-8} \text{ M}$  o menos, por ejemplo, de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo, de  $10^{-9} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ ). En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-CD20 se une a un epítipo de CD20 que se conserva entre CD20 de especies diferentes.

Con "anticuerpo anti-CD20 de tipo II" se quiere decir un anticuerpo anti-CD20 que tiene propiedades de unión y actividades biológicas de anticuerpos anti-CD20 de tipo II como se describe en Cragg *et al.*, Blood 103 (2004) 2738-2743; Cragg *et al.*, Blood 101 (2003) 1045-1052, Klein *et al.*, mAbs 5 (2013), 22-33, y se resume en la tabla 1 a continuación.

**TABLA A. Propiedades de los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y de tipo II**

anticuerpos anti-CD20 de tipo I	anticuerpos anti-CD20 de tipo II
Se unen al epítipo de CD20 de clase I	Se unen al epítipo de CD20 de clase II
Localizan a CD20 en balsas lipídicas	No localizan a CD20 en balsas lipídicas
CDC alta*	CDC baja*
Actividad ADCC *	Actividad ADCC*
Capacidad de unión completa a linfocitos B	Aprox. la mitad de capacidad de unión a linfocitos B
Agregación homotípica débil	Agregación homotípica
Inducción de muerte celular baja	Inducción de muerte celular fuerte

\* en el caso de isotipo IgG<sub>1</sub>

Los ejemplos de anticuerpos anti-CD20 de tipo II incluyen, por ejemplo, obinutuzumab (GA101), tositumumab (B1), IgG1 de anticuerpo B-Ly1 humanizado (un anticuerpo IgG1 humanizado quimérico como se divulga en el documento WO 2005/044859), IgG1 11B8 (como se divulga en el documento WO 2004/035607) e IgG1 AT80.

En un aspecto, el anticuerpo anti-CD20 de tipo II comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>CD20) que comprende la HCDR1 de SEQ ID NO: 73, la HCDR2 de SEQ ID NO: 74 y la HCDR3 de SEQ ID NO: 75 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>CD20) que comprende la LCDR1 de SEQ ID NO: 76, la LCDR2 de SEQ ID NO: 77 y la LCDR3 de SEQ ID NO: 78. En otro aspecto, el anticuerpo anti-CD20 de tipo II se genomanipula para tener una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo no genomanipulado. En un aspecto, al menos aproximadamente un 40 % de los oligosacáridos enlazados a N en la región Fc del anticuerpo anti-CD20 de tipo II están no fucosilados.

En un aspecto particular, el anticuerpo anti-CD20 de tipo II es obinutuzumab (DCI recomendada, WHO Drug Information, vol. 26, n.º 4, 2012, p. 453). Como se usa en el presente documento, obinutuzumab es sinónimo de GA101. El nombre comercial es GAZYVA® o GAZYVARO®. Esto reemplaza todas las versiones previas (por ejemplo, vol. 25, n.º 1, 2011, p. 75-76) y es conocido anteriormente como afutuzumab (DCI recomendada, WHO Drug Information, vol. 23, n.º 2, 2009, p. 176; vol. 22, n.º 2, 2008, p. 124). En un modo de realización, el anticuerpo anti-CD20 de tipo II comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 79 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 80. En un aspecto, el anticuerpo anti-CD20 de tipo II es tositumomab.

Con "anticuerpo anti-CD20 de tipo I" se quiere decir un anticuerpo anti-CD20 seleccionado del grupo que consiste en rituximab, ofatumumab, veltuzumab, ocaratuzumab, ocrelizumab, PRO13921, ublituximab, IgG3 HI47 (ECACC, hibridoma), IgG1 2C6 (como se divulga en el documento WO 2005/103081), IgG1 2F2 (como se divulga en los documentos WO 2004/035607 y WO 2005/103081) e IgG1 2H7 (como se divulga en el documento WO 2004/056312). Un anticuerpo anti-CD20 de tipo I particular es rituximab.

"Rituximab" es un anticuerpo monoclonal que contiene el dominio constante murino gamma 1 humano quimérico genomanipulado dirigido contra el antígeno CD20 humano. Este anticuerpo quimérico contiene dominios constantes gamma 1 humanos y se identifica con el nombre de "C2B8" en el documento US 5.736.137 (Andersen *et al.*) expedido el 17 de abril de 1998, cedido a IDEC Pharmaceuticals Corporation. Rituximab está aprobado para el tratamiento de pacientes con linfoma no hodgkiniano de linfocitos B, positivo para CD20, de escasa malignidad o folicular recidivante o resistente al tratamiento. Los estudios *in vitro* del mecanismo de acción han demostrado que rituximab presenta citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) humana (Reff, M.E., *et al.*, Blood 83 (1994) 435-445). Adicionalmente, presenta actividad significativa en ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Rituximab no está afucosilado.

El término "anticuerpo B-Ly1 humanizado" se refiere a un anticuerpo B-Ly1 humanizado, como se divulga en los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875, que se obtuvo a partir del anticuerpo anti-CD20 monoclonal murino B-Ly1 (región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) murina: SEQ ID NO: 64; región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) murina: SEQ ID NO: 65 (véase Poppema, S. y Visser, L., Biotest Bulletin 3 (1987) 131-139) por quimerización con un dominio constante humano de IgG1 y seguido de humanización (véanse los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). Estos "anticuerpos B-Ly1 humanizados" se divulgan en detalle en los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875.

El término "**reducción**" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "reducir" o "reduciendo"), por ejemplo, reducción del número de linfocitos B o liberación de citocinas, se refiere a una disminución de la respectiva cantidad, como se mide por procedimientos apropiados conocidos en la técnica. Por claridad, el término incluye también la reducción hasta cero (o por debajo del límite de detección del procedimiento analítico), es decir, la supresión o eliminación completa. Por el contrario, "**incrementada**" se refiere a un incremento de la respectiva cantidad.

Un "**antígeno para linfocito T**" como se usa en el presente documento se refiere a un determinante antigénico presentado en la superficie de un linfocito T, en particular, un linfocito T citotóxico.

Un "**agente terapéutico activador de linfocitos T**" como se usa en el presente documento se refiere a un agente terapéutico que puede inducir la activación de linfocitos T en un sujeto, en particular, un agente terapéutico diseñado para inducir la activación de linfocitos T en un sujeto. Los ejemplos de agentes terapéuticos activadores de linfocitos T incluyen anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a un antígeno para linfocito T activador, tal como CD3, y un antígeno para célula diana, tal como CD20 o CD19. Otros ejemplos incluyen receptores de antígenos quiméricos (CAR) que comprenden un dominio activador de linfocitos T y un resto de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno para célula diana, tal como CD20 o CD19.

Un "**antígeno para linfocito T activador**" como se usa en el presente documento se refiere a un determinante antigénico expresado por un linfocito T, en particular, un linfocito T citotóxico, que puede inducir o potenciar la activación de linfocitos T tras la interacción con una molécula de unión a antígeno. Específicamente, la interacción de una molécula de unión a antígeno con un antígeno para linfocito T activador puede inducir la activación de linfocitos T activando la cascada de señalización del complejo receptor de linfocitos T. Un antígeno para linfocito T activador ejemplar es CD3.

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

El término "**región hipervariable**" o "HVR," como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden, en general, residuos de aminoácido de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), siendo las últimas las de la mayor variabilidad de secuencia y/o estando implicadas en el reconocimiento antigénico. Los bucles hipervariables ejemplares se producen en los residuos de aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las CDR ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácido 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2, y 95-102 de H3. (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Las regiones hipervariables (HVR) también se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR), y estos términos se usan en el presente documento de manera intercambiable en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región particular se ha descrito por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen la superposición o subconjuntos de residuos de aminoácido cuando se comparan entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo esté dentro del alcance del término como se define y usa en el presente documento. Los residuos de aminoácido apropiados que engloban las CDR, como se define por cada una de las referencias citadas anteriormente, se exponen a continuación en la tabla B como comparación. Los números de residuos exactos que engloba una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de forma rutinaria qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

**TABLA B. Definiciones de CDR<sup>1</sup>**

CDR	Kabat	Chothia	AbM <sup>2</sup>
CDR1 de V <sub>H</sub>	31-35	26-32	26-35
CDR2 de V <sub>H</sub>	50-65	52-58	50-58
CDR3 de V <sub>H</sub>	95-102	95-102	95-102
CDR1 de V <sub>L</sub>	24-34	26-32	24-34
CDR2 de V <sub>L</sub>	50-56	50-52	50-56
CDR3 de V <sub>L</sub>	89-97	91-96	89-97

<sup>1</sup> La numeración de todas las definiciones de CDR en la tabla A está de acuerdo con las convenciones de numeración expuestas por Kabat *et al.* (véase a continuación).

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

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

Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden, en general, los residuos de aminoácido que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "residuos determinantes de la especificidad" o "SDR", que son los residuos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de regiones de las CDR llamadas CDR abreviadas o a-CDR. Las a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) aparecen en los residuos de aminoácido 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)). A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos

FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

Como se usa en el presente documento, el término "**madurada en afinidad**" en el contexto de moléculas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos) se refiere a una molécula de unión a antígeno que se deriva de una molécula de unión a antígeno de referencia, por ejemplo, por mutación, se une al mismo antígeno, preferentemente se une al mismo epítipo, que el anticuerpo de referencia; y tiene una mayor afinidad por el antígeno que la de la molécula de unión a antígeno de referencia. La maduración en afinidad, en general, implica la modificación de uno o más residuos de aminoácido en una o más CDR de la molécula de unión a antígeno. Típicamente, la molécula de unión a antígeno madurada en afinidad se une al mismo epítipo que la molécula de unión a antígeno de referencia inicial.

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

Una "**región estructural humana aceptora**" para los propósitos en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una región estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana, como se define a continuación. Una región estructural humana aceptora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunos modos de realización, la región estructural humana aceptora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región estructural de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia de la región estructural consenso humana.

El término anticuerpo "**quimérico**" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

La "**clase**" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente.

Un anticuerpo "**humanizado**" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácido de HVR no humanas y residuos de aminoácido de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) se corresponden con las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR se corresponden con las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "**forma humanizada**" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización. Otras formas de "anticuerpos humanizados" englobadas en el presente documento son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente con respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la divulgación, especialmente con respecto a la unión a C1q y/o unión al receptor de Fc (FcR).

Un anticuerpo "**humano**" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

El término "dominio Fc" o "**región Fc**" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de anticuerpo que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Una región Fc de IgG comprende un dominio CH2 de IgG y un dominio CH3 de IgG. El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende de un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 231 a un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 340. En un modo de realización, una cadena glucídica se fija al dominio CH2. El dominio CH2 en el presente documento puede ser un dominio CH2 de secuencia natural o un dominio CH2 variante. El "dominio CH3" comprende el tramo de residuos C terminales hasta un dominio CH2 en una región Fc (es decir, de un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 341 a un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 447 de una IgG). La región CH3 en el presente documento puede ser un dominio CH3 de secuencia natural o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 con una "protuberancia" ("botón") introducida en una cadena

del mismo y una "cavidad" ("ojal") introducida correspondiente en la otra cadena del mismo; véase la patente de EE. UU. n.º 5.821.333). Dichos dominios CH3 variantes se pueden usar para promover la heterodimerización de dos cadenas pesadas de anticuerpo no idénticas como se describe en el presente documento. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de residuos de aminoácido en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

La tecnología de "**botón en ojal**" se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway *et al.*, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfase de un primer polipéptido y una cavidad ("ojal") correspondiente en la interfase de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se puede situar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). La protuberancia y la cavidad se pueden preparar alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, por mutagénesis específica de sitio o por síntesis peptídica. En un modo de realización específico, una modificación de botón comprende la sustitución aminoacídica T366W en una de las dos subunidades del dominio Fc, y la modificación de ojal comprende las sustituciones aminoacídicas T366S, L368A e Y407V en la otra de las dos subunidades del dominio Fc. En otro modo de realización específico, la subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de botón adicionalmente comprende la sustitución aminoacídica S354C, y la subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de ojal adicionalmente comprende la sustitución aminoacídica Y349C. La introducción de estos dos residuos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades de la región Fc, estabilizando además, por tanto, el dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

Se pretende que una "región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina" incluya variantes alélicas naturales de la región Fc de una inmunoglobulina, así como variantes que tengan alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones pero que no disminuyan sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina de mediar en las funciones efectoras (tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Por ejemplo, se pueden delecionar uno o más aminoácidos del extremo N o extremo C de la región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de la función biológica. Dichas variantes se pueden seleccionar de acuerdo con reglas generales conocidas en la técnica para tener un efecto mínimo sobre la actividad (véase, por ejemplo, Bowie, J. U. *et al.*, Science 247:1306-10 (1990)).

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

Un "**receptor de Fc activador**" es un receptor de Fc que, tras la interacción por una región Fc de un anticuerpo, provoca acontecimientos de señalización que estimulan a la célula que porta el receptor para que realice funciones efectoras. Los receptores de Fc activadores incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89). Un receptor de Fc activador particular es FcγRIIIa humano (véase el n.º de acceso a UniProt P08637, versión 141).

Como se usa en el presente documento, el término "**células efectoras**" se refiere a una población de linfocitos que presentan receptores de restos efectoras, por ejemplo, receptores de citocinas, y/o receptores de Fc en su superficie a través de los que se unen a un resto efector, por ejemplo, una citocina, y/o una región Fc de un anticuerpo y contribuyen a la destrucción de células diana, por ejemplo, células tumorales. Las células efectoras pueden mediar, por ejemplo, efectos citotóxicos o fagocíticos. Las células efectoras incluyen, pero no se limitan a, linfocitos T efectoras tales como linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>, linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup>, linfocitos T γδ, linfocitos NK, linfocitos citolíticos activados por linfocina (LAK) y macrófagos/monocitos.

Un "**ectodominio**" es el dominio de una proteína de membrana que se extiende hacia el espacio extracelular (es decir, el espacio fuera de la célula diana). Los ectodominios son normalmente las partes de las proteínas que inician el contacto con las superficies, lo que da lugar a la transducción de señal. El ectodominio de 4-1BBL como se define en el presente documento se refiere, por tanto, a la parte del 4-1BBL que se extiende hacia el espacio extracelular (el dominio extracelular), pero también incluye partes o fragmentos más cortos del mismo que son responsables de la trimerización y de la unión al 4-1BB receptor correspondiente. El término "ectodominio de

4-1BBL o un fragmento del mismo" se refiere, por tanto, al dominio extracelular de 4-1BBL que forma el dominio extracelular o a partes del mismo que todavía se pueden unir al receptor (dominio de unión a receptor).

5 "**4-1BBL**" o "**ligando para 4-1BB**" o "**CD137L**" es un miembro de la familia de ligandos para TNF coestimuladores que puede coestimular la proliferación y producción de citocinas de linfocitos T. Los ligandos de la familia de TNF pueden coestimular las señales de TCR tras la interacción con sus receptores de TNF correspondientes; y la interacción con sus receptores da lugar al reclutamiento de factores asociados a TNFR (TRAF), que inician cascadas de señalización que dan como resultado la activación de linfocitos T. 4-1BBL es una proteína transmembranaria de tipo II. Se ha descrito que el 4-1BBL de longitud completa o total que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 forma trímeros en la superficie de las células. La formación de trímeros está habilitada por motivos específicos del ectodominio de 4-1BBL. Dichos motivos se denominan en el presente documento "región de trimerización". Los aminoácidos 50-254 de la secuencia de 4-1BBL humano (SEQ ID NO: 67) forman el dominio extracelular de 4-1BBL, pero incluso fragmentos del mismo pueden formar los trímeros. En modos de realización específicos, el término "ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4 (aminoácidos 52-254 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 1 (aminoácidos 71-254 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 3 (aminoácidos 80-254 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 2 (aminoácidos 85-254 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 5 (aminoácidos 71-248 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 6 (aminoácidos 85-248 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 7 (aminoácidos 80-248 de 4-1BBL humano) y SEQ ID NO: 8 (aminoácidos 52-248 de 4-1BBL humano), pero también se incluyen en el presente documento otros fragmentos del ectodominio que se pueden trimerizar.

El término "**4-1BB**" o "**CD137**", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier 4-1BB natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas) a menos que se indique de otro modo. El término engloba 4-1BB sin procesar "de longitud completa" así como cualquier forma de 4-1BB que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de 4-1BB, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de un 4-1BB humano ejemplar se muestra en la SEQ ID NO: 68 (n.º de acceso a Uniprot Q07011), la secuencia de aminoácidos de un 4-1BB murino ejemplar se muestra en la SEQ ID NO: 69 (n.º de acceso a Uniprot P20334) y la secuencia de aminoácidos de un 4-1BB de macaco cangrejero ejemplar (de *Macaca mulatta*) se muestra en la SEQ ID NO: 70 (n.º de acceso a Uniprot F6W5G6).

Los términos "**anticuerpo anti-4-1BB**", "anti-4-1BB", "anticuerpo para 4-1BB" y "un anticuerpo que se une específicamente a 4-1BB" se refieren a un anticuerpo que se puede unir a 4-1BB con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al seleccionar como diana 4-1BB. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-4-1BB a una proteína distinta de 4-1BB no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a 4-1BB como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoanálisis (RIA) o citometría de flujo (FACS). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une a 4-1BB tiene una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,01 \text{ nM}$  o  $\leq 0,001 \text{ nM}$  (por ejemplo, de  $10^{-6} \text{ M}$  o menos, por ejemplo, de  $10^{-68} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo, de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-10} \text{ M}$ ). Por ejemplo, urelumab es un anticuerpo anti-4-1BB derivado del anticuerpo 20H4.9.

El término "**conector peptídico**" se refiere a un péptido que comprende uno o más aminoácidos, típicamente de aproximadamente 2 a 20 aminoácidos. Los conectores peptídicos son conocidos en la técnica o se describen en el presente documento. Los péptidos conectores no inmunógenos adecuados, por ejemplo, son los conectores peptídicos  $(G_4S)_n$ ,  $(SG_4)_n$  o  $G_4(SG_4)_n$ , en los que "n" es, en general, un número entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4, en particular 2, es decir, los péptidos seleccionados del grupo que consiste en GGGGS (SEQ ID NO: 81) GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 82), SGGGGS (SEQ ID NO: 83) y GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 84), pero también incluyen las secuencias GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 85),  $(G_4S)_3$  (SEQ ID NO: 86),  $(G_4S)_4$  (SEQ ID NO: 87), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 88), GSGSGNGS (SEQ ID NO: 89), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 90), GSGSGS (SEQ ID NO: 91), GSGS (SEQ ID NO: 92), GSGSNGSG (SEQ ID NO: 93), GONGSGSG (SEQ ID NO: 94) y GGNGSG (SEQ ID NO: 95). Los conectores peptídicos de particular interés son  $(G_4S)$  (SEQ ID NO: 81) y  $(G_4S)_2$  (SEQ ID NO: 82).

El término "**aminoácido**" como se usa en la presente solicitud indica el grupo de carboxi- $\alpha$ -aminoácidos naturales que comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

Con "fusionado" o "conectado" se quiere decir que los componentes (por ejemplo, un polipéptido y un ectodominio de 4-1BBL) están enlazados por enlaces peptídicos, directamente o bien por uno o más conectores peptídicos.

El "**porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos**" con respecto a una secuencia polipeptídica (proteica) de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que

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

100 veces la fracción  $X/Y$

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

En determinados modos de realización, se contemplan **variantes de secuencia de aminoácidos** de las moléculas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de las moléculas de unión a antígeno. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de las moléculas de unión a antígeno introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica las moléculas, o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno. Los sitios de interés para mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y regiones estructurales (FR). Se proporcionan sustituciones conservadoras en la tabla C bajo el encabezado "sustituciones preferentes" y se describen además a continuación en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos de (1) a (6). Se pueden introducir sustituciones aminoacídicas en la molécula de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejoradas.

**TABLA C**

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

El término "**variantes de secuencia de aminoácidos**" incluye variantes sustanciales en las que hay sustituciones aminoacídicas en uno o más residuos de la región hipervariable de una molécula de unión a antígeno original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para otro estudio tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenicidad reducida) en relación con la molécula de unión a antígeno original y/o tendrán determinadas propiedades biológicas sustancialmente retenidas de la molécula de unión a antígeno original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo madurado en afinidad, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración en afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, uno o más residuos de CDR se mutan y las moléculas de unión a antígeno variantes se presentan en fagos y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión). En determinados modos de realización, se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más CDR siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad de la molécula de unión a antígeno de unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las CDR. Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se pueden seleccionar como diana para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este procedimiento, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys, y Glu) se identifican y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-molécula de unión a antígeno para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos se pueden seleccionar como diana o eliminar como candidatos para la sustitución. Se pueden cribar variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de únicos o múltiples residuos de aminoácido. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen moléculas de unión a antígeno con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula incluyen la fusión al extremo N o C a un polipéptido que incrementa la semivida en suero de las moléculas de unión a antígeno.

En determinados modos de realización, las moléculas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento se alteran para incrementar o disminuir el grado en que se glucosila el anticuerpo. Las variantes de glucosilación de las moléculas se pueden obtener convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de

modo que se crean o se retiran uno o más sitios de glucosilación. Cuando la molécula de unión a antígeno comprende una región Fc, el carbohidrato fijado a la misma se puede alterar. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que, en general, está fijado por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa fijada a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunos modos de realización, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en las moléculas de unión a antígeno para crear variantes con determinadas propiedades mejoradas. En un aspecto, se proporcionan variantes de moléculas de unión a antígeno que tienen una estructura glucídica que carece de fucosa fijada (directa o indirectamente) a una región Fc. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada, véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 (Presta, L.) o US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Otras variantes de las moléculas de unión a antígeno incluyen aquellas con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarico fijado a la región Fc está bisecado por GlcNAc. Dichas variantes pueden tener fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada, véase, por ejemplo, el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); patente de EE. UU. n.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido fijado a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

La "genomanipulación", en particular, con el prefijo "gluco", así como el término "genomanipulación de glucosilación" incluye la genomanipulación metabólica del mecanismo de glucosilación de una célula, incluyendo las manipulaciones genéticas de las vías de síntesis de los oligosacáridos para lograr una glucosilación alterada de las glucoproteínas expresadas en las células. Además, la genomanipulación de glucosilación incluye los efectos de mutaciones y del entorno celular sobre la glucosilación. En un aspecto, la genomanipulación de glucosilación es una alteración en la actividad glucosiltransferasa. En un aspecto particular, la genomanipulación da como resultado una actividad glucosaminiltransferasa y/o actividad fucosiltransferasa alteradas. Se puede usar genomanipulación de glucosilación para obtener una "célula huésped que tenga actividad GnTIII incrementada" (por ejemplo, una célula huésped que se haya manipulado para expresar niveles incrementados de uno o más polipéptidos que tengan actividad  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), una "célula huésped que tenga actividad ManII incrementada" (por ejemplo, una célula huésped que se haya manipulado para expresar niveles incrementados de uno o más polipéptidos que tengan actividad  $\alpha$ -manosidasa II (ManII)) o una "célula huésped que tenga actividad  $\alpha(1,6)$ -fucosiltransferasa disminuida" (por ejemplo, una célula huésped que se haya manipulado para expresar niveles disminuidos de  $\alpha(1,6)$ -fucosiltransferasa).

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido que tiene actividad GnTIII" se refiere a polipéptidos que pueden catalizar la adición de un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en un enlace  $\beta$ -1,4 al manósido enlazado a  $\beta$  del núcleo de trimanosilo de oligosacáridos enlazados a N. Esto incluye polipéptidos de fusión que presentan actividad enzimática similar a, pero no necesariamente idéntica a, una actividad de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como  $\beta$ -1,4-manosil-glicoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminil-transferasa (EC 2.4.1.144), de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), como se mide en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso donde existe dependencia de la dosis, no necesita ser idéntica a la de GnTIII, sino más bien sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada en comparación con la GnTIII (es decir, el polipéptido candidato presentará mayor actividad o no más de aproximadamente 25 veces menos y, preferentemente, no más de aproximadamente diez veces menos actividad y, lo más preferentemente, no más de aproximadamente tres veces menos actividad en relación con la GnTIII).

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

En determinados aspectos, se contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las

funciones efectoras, que lo hacen un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aunque aún determinadas funciones efectoras (tales como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de unión a FcγR (de ahí que probablemente carezca de actividad ADCC), pero retenga su capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véanse, por ejemplo, Hellstrom, I. *et al.* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I. *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radioactivo (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar *in vivo* la actividad ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y, de ahí, que carezca de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al.*, *Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También se pueden realizar determinaciones de unión a FcRn y aclaramiento/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006); documento WO 2013/120929 A1).

Los anticuerpos con una función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581). Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión a FcR mejorada o disminuida. (Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312 y Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)). En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En determinados aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que disminuyen la unión a FcγR, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 234 y 235 de la región Fc (numeración EU de residuos). En un aspecto, las sustituciones son L234A y L235A (LALA). En determinados aspectos, la variante de anticuerpo comprende además D265A y/o P329G en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. En un aspecto, las sustituciones son L234A, L235A y P329G (LALA-PG) en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. (Véase, por ejemplo, el documento WO 2012/130831). En otro aspecto, las sustituciones son L234A, L235A y D265A (LALA-DA) en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana.

En algunos modos de realización, las alteraciones se realizan en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o disminuidas), por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 e Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

En el documento US2005/0014934 (Hinton *et al.*) se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 252, 254, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.371.826; Dall'Acqua, W.F., *et al.* *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 23514-23524).

En determinados aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a FcRn, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 253 y/o 310 y/o 435 de la región Fc (numeración EU de residuos). En determinados aspectos, la variante de anticuerpo comprende una región Fc con las sustituciones aminoacídicas en las posiciones 253, 310 y 435. En un aspecto, las sustituciones son I253A, H310A y H435A en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. Véase, por ejemplo,

Grevys, A. *et al.*, J. Immunol. 194 (2015) 5497-5508.

En otro aspecto, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a FcRn, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 310 y/o 433 y/o 436 de la región Fc (numeración EU de residuos). En determinados aspectos, la variante de anticuerpo comprende una región Fc con las sustituciones aminoacídicas en las posiciones 310, 433 y 436. En un aspecto, las sustituciones son H310A, H433A e Y436A en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. (Véase, por ejemplo, el documento WO 2014/177460 A1).

En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas, que incrementan la unión a FcRn, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 252 y/o 254 y/o 256 de la región Fc (numeración EU de residuos). En determinados aspectos, la variante de anticuerpo comprende una región Fc con sustituciones aminoacídicas en las posiciones 252, 254 y 256. En un modo de realización, las sustituciones son M252Y, S254T y T256E en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana (véanse también Duncan y Winter, Nature 322:738-40 (1988); patente de EE. UU. n.º 5.648.260; patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 en relación con otros ejemplos de variantes de la región Fc.

En determinados aspectos, puede ser deseable crear **variantes genomanipuladas con cisteína** de las moléculas de unión a antígeno, por ejemplo, "tioMab", en las que uno o más residuos de la molécula estén sustituidos con residuos de cisteína. En aspectos particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles de la molécula. Al sustituir esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjugado. En determinados aspectos, se puede sustituir uno cualquiera o más de los siguientes residuos con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Se pueden generar moléculas de unión a antígeno genomanipuladas con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

En determinados aspectos, las moléculas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento se pueden modificar además para contener restos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen pero no se limitan a polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios), dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno/óxido de etileno), polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros fijados al anticuerpo puede variar y, si se fija más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar en base a consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se van a mejorar, si el derivado de anticuerpo biespecífico se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc. En otro aspecto, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteínico que se pueden calentar selectivamente por exposición a la radiación. En un modo de realización, el resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam, N.W. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, longitudes de onda que no dañan a las células normales, pero que calientan el resto no proteínico a una temperatura a la que se destruyen las células proximales al anticuerpo-resto no proteínico.

El término "**polinucleótido**" se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislado, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN derivado de virus o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en los ácidos peptidonucleicos (APN)). El término "molécula de ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

Con molécula de ácido nucleico o polinucleótido "**aislado**" se pretende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha retirado de su entorno natural. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido contenido en un vector se considera aislado para los propósitos de la presente divulgación. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterógenas o polinucleótidos (parcial o sustancialmente) purificados en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula polinucleotídica contenida en células que contienen normalmente la molécula polinucleotídica, pero la molécula polinucleotídica está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural. Las moléculas de ARN aislado incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro*, así como formas de hebra positiva y negativa, y formas bicatenarias. Los polinucleótidos o ácidos

nucleicos aislados incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, sitio de unión a ribosoma o un finalizador de la transcripción.

5 Con un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia, se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto porque la secuencia de polinucleótido puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia se puede delecionar o sustituir con otro nucleótido, o un número de nucleótidos hasta un 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Como cuestión práctica, se puede determinar de forma convencional si cualquier secuencia de polinucleótido particular es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos usando programas informáticos conocidos, tales como los analizados anteriormente para los polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

20 El término "**casete de expresión**" se refiere a un polinucleótido generado de forma recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y un promotor. En determinados modos de realización, el casete de expresión comprende secuencias de polinucleótido que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas o fragmentos de las mismas.

25 El término "**vector**" o "vector de expresión" es sinónimo de "construcción de expresión" y se refiere a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que se asocia de forma funcional en una célula diana. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. El vector de expresión comprende un casete de expresión. Los vectores de expresión permiten la transcripción de grandes cantidades de ARNm estable. Una vez que el vector de expresión está en el interior de la célula diana, la molécula de ácido ribonucleico o proteína que se codifica por el gen se produce por el mecanismo de transcripción y/o traducción celular. En un modo de realización, el vector de expresión comprende un casete de expresión que comprende secuencias de polinucleótido que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas o fragmentos de las mismas.

40 Los términos "**célula huésped**", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada principal y la descendencia derivada de la misma, independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento. Una célula huésped es cualquier tipo de sistema celular que se puede usar para generar moléculas de unión a antígeno biespecíficas. Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, por nombrar solo unas pocas, pero también células comprendidas en un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado.

55 Una "**cantidad eficaz**" de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para dar como resultado un cambio fisiológico en la célula o tejido al que se administra.

Una "**cantidad terapéuticamente eficaz**" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye, retrasa, minimiza o previene los efectos adversos de una enfermedad.

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

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

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

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

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

25 El término "**cáncer**" como se usa en el presente documento se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas o leucemias linfocíticas, o melanoma.

30 Con "**trastorno proliferativo de linfocitos B**" se quiere decir una enfermedad en la que el número de linfocitos B en un paciente se incrementa en comparación con el número de linfocitos B en un sujeto sano y, en particular, en la que el incremento del número de linfocitos B es la causa o rasgo característico de la enfermedad. Un "trastorno proliferativo de linfocitos B positivos para CD20" es un trastorno proliferativo de linfocitos B en el que los linfocitos B, en particular linfocitos B malignos (además de linfocitos B normales), expresan CD20. Los trastornos de proliferación de linfocitos B ejemplares incluyen linfoma no hodgkiniano (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de la zona marginal (LZM), así como algunos tipos de mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH).

#### **Agonistas de 4-1BB ejemplares**

40 En particular, los agonistas de 4-1BB que comprenden un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 como se usa en combinación con el anticuerpo anti-CD20 son moléculas que comprenden 4-1BBL. En particular, el agonista de 4-1BB usado en la invención comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos.

45 En un aspecto particular, el agonista de 4-1BB es una molécula que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y en la que los ectodominios de 4-1BBL comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, en particular, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5.

50 Se ha demostrado en el presente documento que el agonista de 4-1BB es especialmente útil si comprende un dominio de unión a antígeno que sea específico para una diana tumoral, en particular, para una diana en linfocitos B. Por tanto, en otro aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19.

55 Se ha demostrado además en el presente documento que un agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 no se internalizó por CD19 en linfocitos B y, por tanto, no perdió su capacidad de interactuar con el microentorno tumoral. En otro aspecto, se proporciona un agonista de 4-1BB que no se internalizará en linfocitos B, manteniendo, de este modo, su actividad.

60 En otro aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y un resto que se puede unir específicamente a CD19, en la que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 es reactivo de forma cruzada con respecto a macaco cangrejero, es decir, el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 se une específicamente a CD19 humano y de macaco cangrejero.

65

En otro aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos y al menos un resto que se puede unir específicamente a CD19, en la que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende

5

(a) una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ CD19) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y una región variable de la cadena ligera ( $V_L$ CD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, o

10

(b) un dominio VH que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y un dominio VL que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

15

En un aspecto particular, el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende un dominio VH que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y un dominio VL que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

20

25

En otro aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende tres ectodominios de 4-1BBL o fragmentos del mismo y un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19, en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera ( $V_L$ CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera ( $V_L$ CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. Más en particular, el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera ( $V_L$ CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

30

35

En otro aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende además un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable. En un aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc de IgG, específicamente un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. En particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reduce la unión a un receptor de Fc y/o función efectora. En un aspecto particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G.

40

45

En un aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende

(a) un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19,

50

(b) un primer y un segundo polipéptido que están enlazados entre sí por un enlace disulfuro, en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí por un conector peptídico y en que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo.

55

En un aspecto particular de la divulgación, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende

(a) un dominio Fab que se puede unir específicamente a CD19, y

60

(b) un primer y un segundo polipéptido que están enlazados entre sí por un enlace disulfuro, en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que

65

(i) el primer polipéptido contiene un dominio CH1 o CL y el segundo polipéptido contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en la que el segundo polipéptido está enlazado al primer polipéptido por un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los

mismos que están conectados entre sí y al dominio CH1 o CL por un conector peptídico y en la que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o

5 (ii) el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí y al extremo C del dominio CH3 por un conector peptídico y en la que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico al extremo C del dominio CH3 de dicho polipéptido, o

10 (iii) el primer polipéptido contiene un dominio VH-CL o uno VL-CH1 y el segundo polipéptido contiene un dominio VL-CH1 o un dominio VH-CL, respectivamente, en la que el segundo polipéptido está enlazado al primer polipéptido por un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí y a VH o VL por un conector peptídico y en la que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo conectado por medio de un conector peptídico a VL o VH de dicho polipéptido.

En otro aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende

20 (a) al menos un dominio Fab que se puede unir específicamente a CD19 que comprende una región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o una región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>CD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, y

25 (b) un primer y un segundo polipéptido que están enlazados entre sí por un enlace disulfuro, en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

En un aspecto particular de la divulgación, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno seleccionada del grupo que consiste en

35 a) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;

40 b) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;

45 c) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40;

50 d) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;

55 e) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44;

60 f) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;

65 g) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una segunda cadena

ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;

h) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;

i) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50;

j) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;

k) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y

l) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52.

En otro aspecto de la divulgación, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende además un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable. En un aspecto, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc de IgG, específicamente un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. En particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reduce la unión a un receptor de Fc y/o función efectora. En un aspecto particular, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G.

### **Modificaciones en el dominio Fc que reducen la unión al receptor de Fc y/o la función efectora**

El dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno consiste en un par de cadenas polipeptídicas que comprenden dominios de la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es un dímero, del que cada subunidad comprende los dominios constantes de la cadena pesada de IgG CH2 y CH3. Las dos subunidades del dominio Fc se pueden asociar de forma estable entre sí.

El dominio Fc confiere propiedades farmacocinéticas favorables a las moléculas de unión a antígeno, incluyendo una larga semivida en suero que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una proporción de distribución tejido-sangre favorable. Al mismo tiempo, sin embargo, puede dar lugar a que los anticuerpos bispecíficos seleccionen como diana de forma indeseable células que expresan receptores de Fc en lugar de las células que portan antígenos preferentes. En consecuencia, en aspectos particulares, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno presenta afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida en comparación con un dominio Fc de IgG1 natural. En un aspecto, el Fc no se une sustancialmente a un receptor de Fc ni induce la función efectora. En un aspecto particular, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ. En un aspecto, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En un aspecto específico, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ humano activador, más específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIIa humano, lo más específicamente FcγRIIIa humano. En un aspecto, el dominio Fc no induce la función efectora. La función efectora reducida puede incluir, pero no se limita a, uno o más de los siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, captación de antígenos mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígenos reducida, unión reducida a linfocitos NK, unión reducida a macrófagos, unión reducida a monocitos, unión reducida a células polimorfonucleares, señalización directa que induce apoptosis reducida, maduración de células dendríticas reducida o cebado de linfocitos reducido.

En determinados aspectos, se pueden introducir una o más modificaciones aminoacídicas en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprenda una modificación aminoacídica (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones aminoacídicas.

En un aspecto particular, el dominio Fc comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reduce la unión a un receptor de Fc, en particular, hacia el receptor de Fcγ.

5 En un aspecto, el dominio Fc del anticuerpo comprende una o más mutaciones aminoacídicas que reduce la afinidad de unión del dominio Fc a un receptor de Fc y/o función efectora. Típicamente, las mismas una o más mutaciones aminoacídicas están presentes en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En particular, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en una posición de E233, L234, L235, N297, P331 y P329 (numeración EU). En particular, el dominio Fc comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones 234 y 235 (numeración EU) y/o 329 (numeración EU) de las cadenas pesadas de IgG. Más en particular, se proporciona un anticuerpo que comprende un dominio Fc con las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G ("P329G LALA", numeración EU) en las cadenas pesadas de IgG. Las sustituciones aminoacídicas L234A y L235A se refieren a la llamada mutación LALA. La combinación "P329G LALA" de sustituciones aminoacídicas anula casi por completo la unión al receptor de Fcγ de un dominio Fc de IgG1 humana y se describe en la pub. de sol. de patente internacional n.º WO 2012/130831 A1 que también describe procedimientos de preparación de dichos dominios Fc mutantes y procedimientos para determinar sus propiedades tales como la unión al receptor de Fc o funciones efectoras.

20 Los dominios Fc con unión al receptor de Fc y/o función efectora reducidas incluyen también aquellas con sustitución de uno o más de los residuos de dominio Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de la región Fc (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

25 En otro aspecto, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4. Los anticuerpos de IgG4 presentan una afinidad de unión reducida por receptores de Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con anticuerpos de IgG1. En un aspecto más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 que comprende una sustitución aminoacídica en la posición S228 (numeración de Kabat), en particular la sustitución aminoacídica S228P. En un aspecto más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 que comprende las sustituciones aminoacídicas L235E y S228P y P329G (numeración EU). Dichos mutantes de dominio Fc de IgG4 y sus propiedades de unión al receptor de Fcγ también se describen en el documento WO 2012/130831.

30 Se pueden preparar dominios Fc mutantes por delección, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis específica de sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios de nucleótidos correctos se pueden verificar, por ejemplo, por secuenciación.

35 La unión a receptores de Fc se puede determinar fácilmente, por ejemplo, por ELISA, o por resonancia de plasmón superficial (RPS) usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores de Fc tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. De forma alternativa, se puede evaluar la afinidad de unión de dominios Fc o anticuerpos activadores de células que comprendan un dominio Fc por los receptores de Fc usando líneas celulares conocidas por expresar receptores de Fc particulares, tales como linfocitos NK humanos que expresan el receptor de FcγIIIa.

40 La función efectora de un dominio Fc, o anticuerpos que comprenden un dominio Fc, se puede medir por procedimientos conocidos en la técnica. Un ensayo adecuado para medir la ADCC se describe en el presente documento. Otros ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362; Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patente de EE. UU. n.º 5.821.337; Bruggemann *et al.*, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radioactivo (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar la actividad ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

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

65 **Modificaciones en el dominio Fc que promueven la heterodimerización**

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas comprenden diferentes sitios de unión a antígeno, fusionados a una o la otra de las dos subunidades del dominio Fc, por tanto las dos subunidades del dominio Fc pueden estar comprendidas en dos cadenas polipeptídicas no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización dan lugar a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de los anticuerpos biespecíficos en la producción recombinante, será ventajoso, por tanto, introducir en el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

En consecuencia, en aspectos particulares la invención se refiere a la molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende (a) un resto que se puede unir específicamente a CD19, (b) un primer y un segundo polipéptido que están enlazados entre sí por un enlace disulfuro, en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 que están conectados entre sí por un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho 4-1BBL que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable, en la que el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más extensa entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana es en el dominio CH3 del dominio Fc. Por tanto, en un aspecto, dicha modificación está en el dominio CH3 del dominio Fc.

En un aspecto específico, dicha modificación es una modificación llamada "botón en ojal", que comprende una modificación de "botón" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de "ojal" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc. Por tanto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que comprende (a) un resto que se puede unir específicamente a un CD19, (b) un primer y un segundo polipéptido que están enlazados entre sí por un enlace disulfuro, en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 que están conectados entre sí por un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho 4-1BBL comprendiendo 4-1BBL la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable, en la que la primera subunidad del dominio Fc comprende botones y la segunda subunidad del dominio Fc comprende ojales de acuerdo con el procedimiento de botones en ojales. En un aspecto particular, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas S354C y T366W (numeración EU) y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas Y349C, T366S e Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en el documento US 5.731.168; el documento US 7.695.936; Ridgway *et al.*, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfase de un primer polipéptido y una cavidad ("ojal") correspondiente en la interfase de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se puede situar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

En consecuencia, en un aspecto, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas, un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando, de este modo, una protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad que se puede situar en una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando, de este modo, una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad en el que se puede situar la protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad. La protuberancia y la cavidad se pueden preparar alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, por mutagénesis específica de sitio o por síntesis peptídica. En un aspecto específico, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza por un residuo de triptófano (T366W), y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc el residuo de tirosina en la posición 407 se reemplaza por un residuo de valina (Y407V). En un aspecto, en la segunda subunidad del dominio Fc adicionalmente el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza por un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se reemplaza por un residuo de alanina (L368A).

Aún en otro aspecto, en la primera subunidad del dominio Fc adicionalmente el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza por un residuo de cisteína (S354C), y en la segunda subunidad del dominio Fc adicionalmente el residuo de tirosina en la posición 349 se reemplaza por un residuo de cisteína (Y349C). La introducción de estos dos residuos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc que estabiliza además el dímero (Carter (2001), *J Immunol Methods* 248, 7-15). En un aspecto particular, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas S354C y T366W (numeración EU) y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas Y349C, T366S e Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto alternativo, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media en los efectos de conducción electrostática, por ejemplo, como se describe en la publicación PCT WO 2009/089004. En general, este procedimiento implica el reemplazo de uno o más residuos de aminoácido en la interfase de las dos subunidades del dominio Fc por residuos de aminoácido cargados, de modo que la formación de un homodímero se vuelva electrostáticamente desfavorable, pero la heterodimerización electrostáticamente favorable.

El extremo C de la cadena pesada del anticuerpo biespecífico como se informa en el presente documento puede ser un extremo C completo que termine con los residuos de aminoácido PGK. El extremo C de la cadena pesada puede ser un extremo C acortado en el que se hayan retirado uno o dos de los residuos de aminoácido C terminales. En un aspecto preferente, el extremo C de la cadena pesada es un extremo C acortado que termina en PG. En un aspecto de todos los aspectos como se informa en el presente documento, un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 C terminal como se especifica en el presente documento, comprende el dipéptido glicina-lisina C terminal (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto de todos los aspectos como se informa en el presente documento, un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 C terminal, como se especifica en el presente documento, comprende un residuo de glicina C terminal (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

#### Modificaciones en los dominios Fab

Los anticuerpos multiespecíficos con un reemplazo/intercambio de dominio en un brazo de unión (CrossMabVH-VL o CrossMabCH-CL) se describen en detalle en el documento WO2009/080252 y Schaefer, W. *et al.*, *PNAS*, 108 (2011) 11187-1191. Reducen claramente los subproductos provocados por el emparejamiento erróneo de una cadena ligera frente a un primer antígeno con la cadena pesada equivocada frente al segundo antígeno (en comparación con enfoques sin dicho intercambio de dominio).

En un aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende (a) un primer fragmento Fab que se puede unir específicamente a CD19, (b) un primer y un segundo polipéptido que están enlazados entre sí por un enlace disulfuro, en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 que están conectados entre sí por un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de 4-1BBL que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y en la que cada uno de ellos está enlazado a un dominio CH1 o CL, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable, en la que los dominios constantes CL y CH1 contiguos a 4-1BBL se reemplazan entre sí de modo que el dominio CH1 sea parte de la cadena ligera y el dominio CL sea parte de la cadena pesada.

En otro aspecto, y para mejorar además el emparejamiento correcto, la molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende (a) un primer fragmento Fab que se puede unir específicamente a CD19, (b) un primer y un segundo polipéptido que están enlazados entre sí por un enlace disulfuro, en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 que están conectados entre sí por un conector peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de 4-1BBL que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y en la que cada uno de ellos está enlazado a un dominio CH1 o CL, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable, puede contener diferentes sustituciones aminoacídicas cargadas (los llamados "residuos cargados"). Estas modificaciones se introducen en los dominios CH1 y CL cruzados o no cruzados. En un aspecto particular, la divulgación se refiere a una molécula de unión a antígeno biespecífica, en la que en uno de los dominios CL el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se ha sustituido con lisina (K) y en la que en uno de los dominios CH1 los aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y en la posición 213 (numeración EU) se han sustituido con ácido glutámico (E).

Más en particular, la divulgación se refiere a una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende un Fab, en la que en el dominio CL contiguo al miembro de la familia de ligandos para TNF el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se ha sustituido con lisina (K), y en la que en el dominio CH1 contiguo al miembro de la familia de ligandos para TNF los aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y en la posición 213 (numeración EU) se han sustituido con ácido glutámico (E).

### Polinucleótidos

Se proporcionan además polinucleótidos aislados que codifican un anticuerpo biespecífico como se describe en el presente documento o un fragmento del mismo.

Los polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos de la divulgación se pueden expresar como un único polinucleótido que codifique toda la molécula de unión a antígeno o como múltiples (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos que se coexpresen. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se coexpresan se pueden asociar a través de, por ejemplo, enlaces disulfuro u otros medios para formar una molécula de unión a antígeno funcional. Por ejemplo, la porción de la cadena ligera de una inmunoglobulina se puede codificar por un polinucleótido separado de la porción de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Cuando se coexpresan, los polipéptidos de la cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de la cadena ligera para formar la inmunoglobulina.

En algunos aspectos, el polinucleótido aislado codifica todo el anticuerpo como se describe en el presente documento. En otros modos de realización, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido comprendido en el anticuerpo como se describe en el presente documento.

En determinados modos de realización, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otros modos de realización, un polinucleótido es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN de la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario.

### Procedimientos recombinantes

Los anticuerpos biespecíficos como se usa en la divulgación se pueden obtener, por ejemplo, por síntesis peptídica en estado sólido (por ejemplo, síntesis de Merrifield en fase sólida) o producción recombinante. Para la producción recombinante, se aíslan uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmentos polipeptídicos del mismo, por ejemplo, como se describe anteriormente, y se insertan en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho polinucleótido se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales. En un aspecto, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos. Se pueden usar procedimientos que sean bien conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan la secuencia codificante del anticuerpo (fragmento) junto con señales de control de la transcripción/traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación/recombinación genética *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); y Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que se clona el polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmentos polipeptídicos del mismo (es decir, la región codificante) en asociación funcional con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o traducción. Como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón finalizador" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, se puede considerar que es parte de una región codificante, si está presente, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, finalizadores de la transcripción, intrones, regiones no traducidas 5' y 3', y similares, no es parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes pueden estar presentes en una única construcción polinucleotídica, por ejemplo, en un único vector, o en construcciones polinucleotídicas separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector como se divulga en el presente documento puede codificar uno o más polipéptidos, que se separen pos- o cotraduccionalmente en las proteínas finales por medio de escisión proteolítica. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico, puede codificar regiones codificantes heterógenas, fusionadas o bien no fusionadas a un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmentos polipeptídicos del mismo, o variantes o derivados de del mismo. Las regiones codificantes heterógenas incluyen sin limitación elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterógeno. Una asociación funcional es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal forma que dispone la expresión del producto génico bajo la influencia o control de la(s) secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con la misma) se "asocian de forma

funcional" si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión de dirigir la expresión del producto génico ni interfiere con la capacidad del molde de ADN de transcribirse. Por tanto, una región promotora se asociaría de forma funcional con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor puede efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de finalización de la transcripción, se pueden asociar de forma funcional con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula.

Los promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción se divulgan en el presente documento. Una variedad de regiones de control de la transcripción son conocidas para los expertos en la técnica. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción, que funcionan en células de vertebrado, tales como, pero sin limitarse a, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano inmediato, junto con intrón-A), virus de simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tales como, por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen aquellas derivadas de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovina y  $\alpha$ -globina de conejo, así como otras secuencias que pueden controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles (por ejemplo, promotores inducibles por tetraciclinas). De forma similar, una variedad de elementos de control de la traducción son conocidos para los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a sitios de unión a ribosomas, codones de iniciación y finalización de la traducción y elementos derivados de sistemas víricos (en particular un sitio de entrada del ribosoma interno o IRES, también denominado secuencia CITE). El casete de expresión también puede incluir otros rasgos característicos tales como un origen de replicación y/o elementos de integración cromosómica tales como repeticiones terminales largas (RTL) retrovíricas o repeticiones terminales invertidas (RTI) víricas adenoasociadas (VAA).

Las regiones codificantes de polinucleótidos y ácidos nucleicos se pueden asociar con regiones codificantes adicionales que codifiquen péptidos secretores o señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido como se divulga en el presente documento. Por ejemplo, si se desea la secreción del anticuerpo o fragmentos polipeptídicos, el ADN que codifica una secuencia señal se puede disponer en dirección 5' del ácido nucleico de un anticuerpo como se divulga en el presente documento o fragmentos polipeptídicos del mismo. De acuerdo con la hipótesis de señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína creciente a través del retículo endoplásmico rugoso. Los expertos en la técnica saben que los polipéptidos secretados por células de vertebrado, en general, tienen un péptido señal fusionado al extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinados modos de realización se usa el péptido señal natural, por ejemplo, un péptido señal de cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que retiene la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que se asocia de forma funcional con él. De forma alternativa, se puede usar un péptido señal de mamífero heterólogo, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, se puede sustituir la secuencia líder natural con la secuencia líder del activador tisular del plasminógeno (TPA) humano o  $\beta$ -glucuronidasa de ratón.

El ADN que codifica una secuencia proteica corta que se podría usar para facilitar la purificación más tarde (por ejemplo, una marca de histidina) o ayudar al marcaje de la proteína de fusión se puede incluir dentro o en los extremos del polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmentos polipeptídicos del mismo.

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos. En determinados modos de realización, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, descritos en el presente documento en relación con polinucleótidos y vectores, respectivamente. En un aspecto, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) un vector que comprende un polinucleótido que codifica (parte de) un anticuerpo. Como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de sistema celular que se puede genomanipular para generar las proteínas de fusión o fragmentos de las mismas. Las células huésped adecuadas para replicar y para respaldar la expresión de moléculas de unión a antígeno son bien conocidas en la técnica. Dichas células se pueden transfectar o transducir según sea apropiado con el vector de expresión particular y se pueden cultivar grandes cantidades de células que contienen vectores para sembrar fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes de la molécula de unión a antígeno para aplicaciones clínicas. Las células huésped adecuadas incluyen microorganismos procariontes, tales como *E. coli*, o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto o similares. Por ejemplo, se pueden producir polipéptidos en bacterias, en particular cuando no es necesaria la glucosilación. Después de la expresión, se puede aislar el polipéptido a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente. Además de procariontes, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras con vías

de glucosilación que se han "humanizado", dando como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross, *Nat Biotech* 22, 1409-1414 (2004) y Li *et al.*, *Nat Biotech* 24, 210-215 (2006).

5 Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también se derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar junto con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas). También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adapten al cultivo en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293T como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, *J Gen Virol* 36, 59 (1977)), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol Reprod* 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI (como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad Sci* 383, 44-68 (1982)), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO dhfr- (Urlaub *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003). Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo unas pocas, pero también células comprendidas en un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado. En un modo de realización, la célula huésped es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). Las tecnologías estándar son conocidas en la técnica para expresar genes exógenos en estos sistemas. Las células que expresan un polipéptido que comprende la cadena pesada o bien la ligera de una inmunoglobulina, se pueden genomanipular para expresar también la otra de las cadenas de inmunoglobulina de modo que el producto expresado es una inmunoglobulina que tiene tanto una cadena pesada como una ligera.

En determinados aspectos, los restos que se pueden unir específicamente a un antígeno para célula diana (por ejemplo, fragmentos Fab) que forman parte de la molécula de unión a antígeno comprenden al menos una región variable de inmunoglobulina que se puede unir a un antígeno. Las regiones variables pueden formar parte de y derivarse de anticuerpos naturales o no naturales y fragmentos de los mismos. Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos no naturales se pueden construir usando síntesis peptídica en fase sólida, se pueden producir de forma recombinante (por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.186.567) o se pueden obtener, por ejemplo, cribando colecciones combinatorias que comprenden cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase, por ejemplo la patente de EE. UU. n.º 5.969.108 concedida a McCafferty).

Se puede usar cualquier especie animal de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas no limitantes útiles pueden ser de origen murino, de primate o humano. Si se pretende que la proteína de fusión sea para uso humano, se puede usar una forma quimérica de inmunoglobulina en la que las regiones constantes de la inmunoglobulina sean de un ser humano. También se puede preparar una forma humanizada o completamente humana de la inmunoglobulina de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.565.332 concedida a Winter). La humanización se puede lograr por diversos procedimientos incluyendo, pero sin limitarse a (a) injertar las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en regiones estructurales y constantes humanas (por ejemplo, anticuerpo receptor) con o sin retención de los residuos estructurales críticos (por ejemplo, los que son importantes para retener buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpo), (b) injertar solo las regiones determinantes de especificidad no humanas (SDR o a-CDR; los residuos cruciales para la interacción anticuerpo-antígeno) en regiones estructurales y constantes humanas, o (c) trasplantar todos los dominios variables no humanos, pero "enmascararlos" con una sección de tipo humana por reemplazo de residuos de superficie. Los anticuerpos humanizados y procedimientos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332, 323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); patentes de EE. UU. n.ºs 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Jones *et al.*, *Nature* 321, 522-525 (1986); Morrison *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239, 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri *et al.*, *Methods* 36, 25-34 (2005) (que describen un injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (que describe el "rebornizado"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36, 43-60 (2005) (que describen el "reordenamiento de FR"); y Osbourn

*et al.*, *Methods* 36, 61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (que describen el enfoque de "selección guiada" al reordenamiento de FR). Las inmunoglobulinas particulares de acuerdo con la divulgación son inmunoglobulinas humanas. Se pueden producir anticuerpos humanos y regiones variables humanas usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Las regiones variables humanas pueden formar parte de y derivarse de anticuerpos monoclonales humanos preparados por el procedimiento de hibridoma (véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). También se pueden preparar anticuerpos humanos y regiones variables humanas administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se haya modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigénica (véase, por ejemplo, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005)). También se pueden generar anticuerpos humanos y regiones variables humanas aislando secuencias de la región variable de clones de Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos (véanse, por ejemplo, Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); y McCafferty *et al.*, *Nature* 348, 552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352, 624-628 (1991)). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab.

En determinados aspectos, se genomanipulan los anticuerpos para que tengan una afinidad de unión potenciada de acuerdo, por ejemplo, con los procedimientos divulgados en la publicación PCT WO 2012/020006 (véanse los ejemplos relacionados con la maduración en afinidad) o la pub. de sol. de pat. de EE. UU. n.º 2004/0132066. Se puede medir la capacidad de las moléculas de unión a antígeno divulgadas en el presente documento de unirse a un determinante antigénico específico a través de un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) o bien a través de otras técnicas conocidas para un experto en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (Liljebäck, *et al.*, *Glyco J* 17, 323-329 (2000)), y ensayos de unión tradicionales (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)). Se pueden usar ensayos de competencia para identificar una molécula de unión a antígeno que compite con un anticuerpo de referencia por su unión a un antígeno particular. En determinados modos de realización, dicha molécula de unión a antígeno competidora se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o uno conformacional) al que se une la molécula de unión a antígeno de referencia. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítipo al que se une una molécula de unión a antígeno en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). En un ensayo de competencia ejemplar, se incubaba antígeno inmovilizado en una solución que comprende una primera molécula de unión a antígeno marcada que se une al antígeno y una segunda molécula de unión a antígeno no marcada que se somete a prueba para determinar su capacidad de competir con la primera molécula de unión a antígeno por su unión al antígeno. La segunda molécula de unión a antígeno puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incubaba antígeno inmovilizado en una solución que comprende la primera molécula de unión a antígeno marcada, pero no la segunda molécula de unión a antígeno no marcada. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al antígeno, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba en relación con la muestra de control, entonces esto indica que la segunda molécula de unión a antígeno está compitiendo con la primera molécula de unión a antígeno por su unión al antígeno. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Los anticuerpos preparados como se describe en el presente documento se pueden purificar por técnicas conocidas en la técnica, tales como cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores tales como carga neta, hidrofobia, hidrofilia, etc., y serán evidentes para los expertos en la técnica. Para la purificación por cromatografía de afinidad se puede usar un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une la molécula de unión a antígeno. Por ejemplo, para la purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas de fusión divulgadas en el presente documento, se puede usar una matriz con proteína A o proteína G. Se pueden usar la cromatografía de afinidad con proteína A o G y la cromatografía de exclusión por tamaño secuenciales para aislar una molécula de unión a antígeno esencialmente como se describe en los ejemplos. La pureza de la molécula de unión a antígeno o fragmentos de la misma se puede determinar por cualquiera de una variedad de procedimientos analíticos bien conocidos incluyendo electroforesis en gel, cromatografía de líquidos de alta presión y similares. Por ejemplo, se demostró que las moléculas de unión a antígeno que contienen 4-1BBL expresadas como se describe en los ejemplos estaban intactas y ensambladas apropiadamente como se demostró por SDS-PAGE reductora y no reductora.

## Ensayos

Las moléculas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento se pueden identificar, cribar o caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o sus actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

## 1. Ensayos de afinidad

La afinidad de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas proporcionadas en el presente documento por el receptor correspondiente se puede determinar por resonancia de plasmón superficial (RPS), usando instrumentación estándar, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores o proteínas diana, tal como se puede obtener por procedimientos de expresión recombinante. La afinidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica por el antígeno para célula diana también se puede determinar por resonancia de plasmón superficial (RPS), usando instrumentación estándar, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores o proteínas diana, tal como se puede obtener por expresión recombinante. Para las moléculas de unión a antígeno CD19-4-1BBL, se han descrito con más detalle los procedimientos en la pub. de sol. de patente internacional n.º WO 2016/075278 A1. De acuerdo con un aspecto, se mide KD por resonancia de plasmón superficial usando una máquina BIAcore® T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

## 2. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, las moléculas de unión a antígeno CD19-4-1BBL como se informa en el presente documento se someten a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno como se describe con más detalle en el ejemplo 2.

## 3. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar la actividad biológica de las moléculas de unión a antígeno CD19-4-1BBL. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, inhibición de la proliferación de linfocitos B o destrucción de linfocitos B. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*. Para las moléculas de unión a antígeno CD19-4-1BBL, se han descrito con más detalle determinados procedimientos en la pub. de sol. de patente internacional n.º WO 2016/075278 A1.

En determinados aspectos, se somete a prueba un anticuerpo como se informa en el presente documento para determinar dicha actividad biológica.

## Composiciones farmacéuticas, formulaciones y vías de administración

En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los agonistas de 4-1BB que comprenden un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 y los anticuerpos anti-CD20 proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos a continuación. En un aspecto, la composición farmacéutica comprende un agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 proporcionado en el presente documento y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, y un anticuerpo anti-CD20. En otro aspecto, una composición farmacéutica comprende un agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, un anticuerpo anti-CD20 y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de unión a antígeno descritas en el presente documento disueltas o dispersadas en un excipiente farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son en general no tóxicas para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, es decir, no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción indeseable cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un anticuerpo y opcionalmente un ingrediente activo adicional será conocida para los expertos en la técnica en vista de la presente divulgación, como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.<sup>a</sup> ed. Mack Printing Company, 1990. En particular, las composiciones son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Como se usa en el presente documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, sales, estabilizantes y combinaciones de los mismos, como será conocido para un experto en la técnica.

Las composiciones parenterales incluyen las diseñadas para administración por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para su inyección, las moléculas de unión a antígeno divulgadas en el presente documento se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De forma alternativa, las proteínas de fusión pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando las proteínas de fusión

divulgadas en el presente documento en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los demás ingredientes enumerados a continuación, como se requiera. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. En general, se preparan dispersiones incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, suspensiones o emulsión, los procedimientos preferentes de preparación son técnicas de secado al vacío o liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de un medio líquido previamente filtrado estéril del mismo. El medio líquido se debe tamponar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido se debe volver isotónico en primer lugar antes de la inyección con solución salina o glucosa suficiente. La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas se debe mantener al mínimo a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener compuestos que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones inyectables oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleatos de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Se pueden atrapar ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences (18.ª ed. Mack Printing Company, 1990). Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. En modos de realización particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable se puede conseguir por el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glucoproteínas hialuronidasas activas a pH neutro solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas hialuronidasas a pH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Se describen formulaciones de anticuerpo liofilizadas ejemplares en la patente de EE. UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586 y el documento WO2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón acetato-histidina.

Además de las composiciones descritas previamente, los anticuerpos también se pueden formular como una preparación de liberación retardada. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, las proteínas de fusión se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a antígeno de la divulgación se pueden fabricar por medio de procedimientos de mezcla, disolución, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o coadyuvantes fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de

las proteínas en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

5 El agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 proporcionado en el presente documento se puede formular en una composición en forma de ácido o base libre, neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que retienen sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Estas incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o dichos ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros próticos que las correspondientes formas de base libre.

15 La composición en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma adversa entre sí. Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

20 En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 y un excipiente farmacéuticamente aceptable, y que comprende un anticuerpo anti-CD20 como se describe en el presente documento. En un aspecto particular, la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento de trastornos proliferativos de linfocitos B, en particular, una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en linfoma no hodgkiniano (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de la zona marginal (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH).

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

**Administración del agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 proporcionado en el presente documento y el anticuerpo anti-CD20**

35 Tanto el agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 como el anticuerpo anti-CD20 (ambos llamados sustancia en el presente documento) se pueden administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Sin embargo, los procedimientos son, en particular, útiles en relación con agentes terapéuticos administrados por infusión parenteral, en particular, intravenosa.

40 Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o prolongada. En el presente documento se contemplan diversas pautas posológicas incluyendo pero sin limitarse a únicas o múltiples administraciones durante diversos puntos temporales, administración por inyección intravenosa rápida e infusión pulsada. En un modo de realización, el agente terapéutico se administra por vía parenteral, en particular, por vía intravenosa. En un aspecto particular, la sustancia se administra por infusión intravenosa. En otro aspecto, la sustancia se administra por vía subcutánea.

50 Tanto el agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 como el anticuerpo anti-CD20 se formularían, dosificarían y administrarían de una manera consecuente con la buena práctica médica. Los factores para su consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular al que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos. Tanto el agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 como el anticuerpo anti-CD20 no se necesitan formular, pero lo están opcionalmente, con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de agente terapéutico presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que es apropiada.

65 Para la prevención o tratamiento de enfermedades, la dosificación apropiada de agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 proporcionado en el presente documento y el anticuerpo anti-CD20 (cuando se usa en su combinación o con uno o más de otros agentes

terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de agente 4-1BB, la gravedad y evolución de la enfermedad, si ambos agentes se administran con propósitos preventivos o terapéuticos, el tratamiento previo, la anamnesis del paciente y la respuesta al agente terapéutico, y el criterio del médico especialista. Cada sustancia se administra adecuadamente al paciente en una sola vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg - 10 mg/kg) de la sustancia puede ser una dosificación candidata inicial para su administración al sujeto, ya sea, por ejemplo, por administraciones separadas o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendría, en general, hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar de cada sustancia estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, se pueden administrar al sujeto una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el sujeto reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo, aproximadamente seis dosis, del agente terapéutico). Se puede administrar una dosis de carga mayor inicial, seguida de una o más dosis menores, o una dosis menor inicial, seguida de una o más dosis mayores. Una pauta posológica ejemplar comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 10 mg, seguido de una dosis dos veces a la semana de aproximadamente 20 mg del agente terapéutico. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El curso de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

En un aspecto, la administración tanto del agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 como del anticuerpo anti-CD20 es una única administración. En determinados aspectos, la administración de la sustancia es de dos o más administraciones. En uno de dichos aspectos, las sustancias se administran cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas, en particular, cada dos semanas. En un aspecto, la sustancia se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. En un aspecto, la sustancia se administra a una dosis de aproximadamente 50 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, aproximadamente 200 µg/kg, aproximadamente 300 µg/kg, aproximadamente 400 µg/kg, aproximadamente 500 µg/kg, aproximadamente 600 µg/kg, aproximadamente 700 µg/kg, aproximadamente 800 µg/kg, aproximadamente 900 µg/kg o aproximadamente 1000 µg/kg. En un modo de realización, el agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 se administra a una dosis que es mayor que la dosis del agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 en una pauta de tratamiento correspondiente sin la administración del anticuerpo anti-CD20. En un aspecto, la administración del agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 proporcionado en el presente documento comprende una administración inicial de una primera dosis del anticuerpo anti-CD20, y una o más administraciones posteriores de una segunda dosis del anticuerpo anti-CD20, en la que la segunda dosis es mayor que la primera dosis. En un aspecto, la administración del agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una administración inicial de una primera dosis del anticuerpo anti-CD20, y una o más administraciones posteriores de una segunda dosis del anticuerpo anti-CD20, en la que la primera dosis no es menor que la segunda dosis.

En un aspecto, la administración del agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 en la pauta de tratamiento de acuerdo con la divulgación es la primera administración al sujeto del agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 (al menos dentro del mismo ciclo de tratamiento). En un aspecto, no se realiza ninguna administración del anticuerpo anti-CD20 al sujeto antes de la administración del agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19. En otro aspecto, el anticuerpo anti-CD20 se administra antes de la administración del agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19.

En otro aspecto, el agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 es para su uso en combinación con un anticuerpo anti-CD20, en el que se realiza un pretratamiento con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferentemente obinutuzumab, antes de la politerapia, en el que el periodo de tiempo entre el pretratamiento y la politerapia es suficiente para la reducción de los linfocitos B en el individuo en respuesta al anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferentemente obinutuzumab.

La activación de los linfocitos T puede dar lugar a un síndrome de liberación de citocinas (SLC) grave. En un estudio de fase 1 llevado a cabo por TeGenero (Suntharalingam *et al.*, N Engl J Med (2006) 355, 1018-1028), los 6 voluntarios sanos experimentaron un síndrome de liberación de citocinas (SLC) grave, casi mortal, rápidamente después de la infusión de un anticuerpo monoclonal anti-CD28 superagonista estimulador de linfocitos T a dosis inapropiada. La liberación de citocinas asociada con la administración a un sujeto de un agente terapéutico activador de linfocitos T, tal como el agonista de 4-1BB que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un antígeno asociado a tumor, en particular, CD19, se puede reducir significativamente por el pretratamiento de dicho sujeto con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, tal como obinutuzumab. El uso del pretratamiento con GAZYVA® (Gpt) debe ayudar en el rápido agotamiento de linfocitos

B, tanto en la sangre periférica como en los órganos linfoides secundarios, de modo que se reduzca el riesgo de acontecimientos adversos (AA) altamente pertinentes derivados de una fuerte activación de linfocitos T sistémica por agentes terapéuticos activadores de linfocitos T (por ejemplo, SLC), mientras que se respaldan niveles de exposición a agentes terapéuticos activadores de linfocitos T que sean lo suficientemente altos desde el inicio de la dosificación para mediar en la eliminación de células tumorales. Hasta la fecha, el perfil de seguridad de obinutuzumab (incluyendo la liberación de citocinas) se ha evaluado y gestionado en cientos de pacientes en ensayos clínicos de obinutuzumab en curso. Finalmente, además de respaldar el perfil de seguridad del agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 proporcionado en el presente documento, Gpt también debería ayudar a prevenir la formación de anticuerpos antifármaco (AAF) para estas moléculas únicas.

La combinación del agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 y el anticuerpo anti-CD20 se puede usar en combinación con uno o más de otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, se puede coadministrar al menos un agente terapéutico adicional. En determinados aspectos, un agente terapéutico adicional es un agente inmunoterápico.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o formulaciones separadas) y la administración separada, caso en el que la administración del agente terapéutico se puede producir antes de, simultáneamente y/o tras la administración de un agente o agentes terapéutico(s) adicional(es). En un modo de realización, la administración del agente terapéutico y la administración de un agente terapéutico adicional se produce en aproximadamente un mes, o en aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí.

## 25 **Composiciones terapéuticas**

CD20 y CD19 se expresan en la mayoría de los linfocitos B (marcadores de linfocitos B universales) con la excepción de células madre y células plasmáticas, y, con frecuencia, se expresan en la mayoría de las neoplasias malignas de linfocitos B humanas (antígeno asociado a tumor), tales como linfoma y leucemias, excepto por mieloma múltiple, por ejemplo, en linfoma no hodgkiniano y leucemia linfoblástica aguda.

Las moléculas biespecíficas que reconocen dos proteínas de superficie celular en diferentes poblaciones celulares ofrecen la promesa de redirigir a las células inmunitarias citotóxicas para la destrucción de células diana patógenas.

En otros aspectos, se proporciona una composición para su uso en inmunoterapia contra el cáncer que comprende un agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 como se proporciona en el presente documento y un anticuerpo anti-CD20. En determinados aspectos, se proporciona una composición que comprende un agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 como se proporciona en el presente documento y un anticuerpo anti-CD20 para su uso en un procedimiento de inmunoterapia contra el cáncer.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona el uso de una composición que comprende un agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 proporcionado en el presente documento y un anticuerpo anti-CD20 en la fabricación o preparación de un medicamento. En un aspecto, el medicamento es para el tratamiento de un trastorno proliferativo de linfocitos B. En otro aspecto, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno proliferativo de linfocitos B, que comprende administrar a un individuo que tiene un trastorno proliferativo de linfocitos B una cantidad eficaz del medicamento. En uno de dichos aspectos, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. En otro aspecto, el medicamento es para agotar los linfocitos B. Los trastornos proliferativos de linfocitos B se seleccionan del grupo que consiste en linfoma no hodgkiniano (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de la zona marginal (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH). En un aspecto particular, el cáncer de linfocitos B es un linfoma no hodgkiniano o leucemia linfoblástica aguda.

Las politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o formulaciones separadas) y la administración separada, caso en el que la administración del anticuerpo como se informa en el presente documento se puede producir antes de, simultáneamente y/o tras la administración del agente o agentes terapéutico(s) adicional(es). En un modo de realización, la administración del anticuerpo anti-CD20 humano y la administración de un agente terapéutico adicional se producen en aproximadamente un mes, o en aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí.

65 Tanto el agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 como el anticuerpo anti-CD20 como se informa en el presente documento (y cualquier agente terapéutico

adicional) se pueden administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o prolongada. En el presente documento se contemplan diversas pautas posológicas incluyendo pero sin limitarse a únicas o múltiples administraciones durante diversos puntos temporales, administración por inyección intravenosa rápida e infusión pulsada.

Tanto el agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 como el anticuerpo anti-CD20, como se informa en el presente documento, se formularían, dosificarían y administrarían de una manera consecuente con la buena práctica médica. Los factores para su consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular al que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos. Los anticuerpos no se necesitan formular, pero lo están opcionalmente, con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos presentes en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que es apropiada.

### Otros agentes y tratamientos

Las moléculas de unión a antígeno se pueden administrar en combinación con uno o más de otros agentes en el tratamiento. Por ejemplo, una proteína de fusión como se describe en el presente documento se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. El término "agente terapéutico" engloba cualquier agente que se puede administrar para tratar un síntoma o enfermedad en un individuo que necesita dicho tratamiento. Dicho agente terapéutico adicional puede comprender cualquier ingrediente activo adecuado para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquel con actividades complementarias que no se ven afectadas de forma adversa entre sí. En determinados modos de realización, un agente terapéutico adicional es otro agente antineoplásico.

Dichos otros agentes están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de proteína de fusión usada, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas se usan, en general, en las mismas dosificaciones y con las mismas vías de administración que se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que es apropiada.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma composición o composiciones separadas) y la administración separada, caso en el que la administración de las moléculas de unión a antígeno divulgadas en el presente documento se puede producir antes de, simultáneamente y/o tras la administración del adyuvante y/o agente terapéutico adicional.

### Artículos de fabricación (kits)

En otro aspecto, se proporciona un kit que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El kit comprende al menos un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí misma o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa con solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que es perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos dos agentes activos en el kit son un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y un agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19.

En un aspecto particular, se proporciona un kit para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un sujeto, que comprende un envase que comprende (A) una primera composición que comprende como ingrediente activo un agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19. y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (B) una segunda composición que comprende como ingrediente activo un anticuerpo anti-CD20 y un excipiente farmacéuticamente aceptable, y (C) instrucciones para usar las composiciones en una politerapia.

La ficha técnica o prospecto del envase indica cómo se usa la composición para tratar la afección de elección y

proporciona las instrucciones para usar las composiciones en una politerapia. Además, el kit puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agonista de 4-1BB que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo anti-CD20. Además, el kit puede comprender uno o más de otros recipientes que comprendan otros ingredientes activos que se puedan usar en combinación. El artículo de fabricación puede comprender además un prospecto del envase que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular.

De forma alternativa, o adicionalmente, el kit puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

15 **Tabla D (secuencias):**

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
1	4-1BBL humano (hu) (71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
2	4-1BBL hu (85-254)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
3	4-1BBL hu (80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
4	4-1BBL hu (52-254)	PWAVSGARASPGSAA SPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
5	4-1BBL humano (hu) (71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
6	4-1BBL hu (85-248)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
7	4-1BBL hu (80-248)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL

ES 2 998 140 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
8	4-1BBL hu (52-248)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSG SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGL
9	CDR-H1 para CD19 (8B8-018)	DYIMH
10	CDR-H2 para CD19 (8B8-018)	YINPYNDGSKYTEKFQG
11	CDR-H3 para CD19 (8B8-018)	GTYYYGSALFDY
12	CDR-L1 para CD19 (8B8-018)	KSSQSLENPNGNTYLN
13	CDR-L2 para CD19 (8B8-018)	RVSKRFS
14	CDR-L3 para CD19 (8B8-018)	LQLTHVPYT
15	CDR-H1 para CD19 (8B8-2B11)	DYIMH
16	CDR-H2 para CD19 (8B8-2B11)	YINPYNDGSKYTEKFQG
17	CDR-H3 para CD19 (8B8-2B11)	GTYYYGPQLFDY
18	CDR-L1 para CD19 (8B8-2B11)	KSSQSLETSTGTTYLN
19	CDR-L2 para CD19 (8B8-2B11)	RVSKRFS
20	CDR-L3 para CD19 (8B8-2B11)	LQLEDPYT
21	VH para CD19 (8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWGGQTTVTVSS
22	VL para CD19 (8B8-018)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNTYL NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIK
23	VH para CD19 (8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP QLFDYWGGQTTVTVSS
24	VL para CD19 (8B8-2B11)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYL NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCLQLEDPYTFGQGTKLEIK
25	4-1BBL hu dimérico (71-254) conectado por conector (G4S) <sub>2</sub>	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGM FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSRSE
26	4-1BBL hu dimérico (85-254) conectado por conector (G4S) <sub>2</sub>	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGS LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE

ES 2 998 140 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
27	4-1BBL hu dimérico (80-254) conectado por conector (G4S) <sub>2</sub>	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSG GGGSDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
28	4-1BBL hu dimérico (52-254) conectado por conector (G4S) <sub>2</sub>	PWAVSGARASPGSAA SPRLREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSG SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGSPWAV SGARASPGSAA SPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF AQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTSELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSRSE
29	4-1BBL hu dimérico (71-248) conectado por conector (G4S) <sub>2</sub>	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGL
30	4-1BBL hu dimérico (85-248) conectado por conector (G4S) <sub>2</sub>	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSLDRQ GMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS YKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGA TVLGLFRVTPEIPAGL
31	4-1BBL hu dimérico (80-248) conectado por conector (G4S) <sub>2</sub>	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPA SSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
32	4-1BBL hu dimérico (52-248) conectado por conector (G4S)2	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSG SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSPWAVSGARA SPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLV AQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKE LVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGL
33	cadena de ojal de Fc anti-CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFGGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
34	cadena anti-CD19(8B8-018) ligera	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLNPNNGNTYL NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFGVPPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGGQTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
35	4-1BBL hu dimérico (71-254)-CL* cadena de botón de Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSRREGPELSPDDPAGLLDLRQGM FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSRTVAAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK

ES 2 998 140 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
36	4-1BBL hu monomérico (71-254)-CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD EKVEPKSC
37	4-1BBL hu dimérico (71-254)-CL cadena de botón de Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGM FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTLKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
38	4-1BBL hu monomérico (71-254)-CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSC

ES 2 998 140 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
39	cadena de ligando dimérico-ojal de Fc anti-CD19(8B8-018)	<p>QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH  WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT  MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS  ALFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK  DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSR  DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV  MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELS  PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP  GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL  RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL  PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR  ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGG  GSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN  VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV  AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR  SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS  AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP  EIPAGLPSRSE</p>
40	ligando monomérico-botón de Fc anti-CD19(8B8-018)	<p>QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH  WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT  MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS  ALFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK  DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR  DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV  MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELS  PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP  GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL  RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL  PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR  ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE</p>

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
41	4-1BBL hu dimérico (71-248)-CL* cadena de botón de Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLG GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALGAPIEKTKSKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
42	4-1BBL hu monomérico (71-248)-CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLG GGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKS C
43	4-1BBL hu dimérico (71-248) - CL cadena de botón de Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLG GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALGAPIEKTKSKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
44	4-1BBL hu monomérico (71-248)-CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVYFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
45	cadena de ligando dimérico (71-248)-ojal de Fc anti-CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGTYYYGSAALFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVYFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
46	ligando monomérico (71-248)-botón de Fc anti-CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGTYYYGSAALFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVYFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
47	cadena de ojal de Fc anti-CD19(8B8-2B11)	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH  WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT  MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP  QLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK  DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  YKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPSSR  DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV  MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
48	cadena ligera para CD19 (8B8-2B11)	<p>DIVMTQTPLSLVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYL  NWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDFRFSGSGSGTD  FTLKISRVEAEDVGVYYCLQLEDPYTFGQGTKLEIK  RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT  LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
49	cadena de ligando dimérico (71-254)-ojal de Fc anti-CD19(8B8-2B11)	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH  WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT  MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP  QLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK  DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  YKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPSSR  DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV  MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELS  PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP  GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL  RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL  PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR  ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGG  GSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN  VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV  AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR  SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS  AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP  EIPAGLPSRSE</p>

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
50	ligando monomérico de Fc (71-254)-botón de anti-CD19(8B8-2B11)	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH  WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT  MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP  QLFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPK  DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  YKCKVSNKALGAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPCR  DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSV  MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELS  PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP  GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL  RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL  PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR  ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE</p>
51	cadena de ligando dimérico de Fc (71-248)-ojal de anti-CD19(8B8-2B11)	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH  WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT  MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP  QLFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVEPLAPSSKSTSGG  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPK  DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  YKCKVSNKALGAPIEKISKAKGQPREPQVCTLPPSR  DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFNCSV  MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELS  PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP  GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL  RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL  PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR  ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGG  GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID  GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG  VYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG  AAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR  LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG  L</p>

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
52	ligando monomérico de Fc (71-248)-botón de anti-CD19(8B8-2B11)	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH  WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT  MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP  QLFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK  DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR  DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV  MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELS  PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP  GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL  RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL  PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR  ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL</p>
53	4-1BBL hu trimérico (71-254) cadena de botón de Fc	<p>REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP  LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY  YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA  ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG  VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP  SPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGM  FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK  EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL  ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF  QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV  LGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPELSP  DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP  GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL  RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL  PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR  ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGSPG  SSSSGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL  MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN  AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  KVSNAKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL  TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV  MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
54	cadena de botón de Fc anti-CD19(8B8-018) fusionada a 4-1BBL hu trimérico (71-254)	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH  WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT  MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS  ALFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK  DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR  DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY</p>

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGG GSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTP EIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL TQGATVGLFRVTPEIPAGLPSRSE
55	cadena de botón de Fc anti-CD19(8B8-2B11) fusionada a 4-1BBL hu trimérico (71-254)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP QLFDYWGQTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGG GSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTP EIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL TQGATVGLFRVTPEIPAGLPSRSE
56	cadena de ojal de Fc de DP47	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSDFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		<p>LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK                      SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT                      PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP                      REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK                      ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQV                      SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDL                      DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH                      YTQKSLSLSPGK</p>
57	cadena ligera de DP47	<p>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY                      QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT                      ISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGQGTKVEIKRTVA                      APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW                      KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKAD                      YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
58	cadena de ojal de Fc de DP47 fusionada a 4-1BBL hu dimérico (71-254)	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW                      VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR                      NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW                      GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC                      LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY                      SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP                      KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS                      RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK                      KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV                      NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN                      QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV                      LLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH                      NHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAG                      LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS                      LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVA                      GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE                      ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW                      QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGG                      SREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDG                      PLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV                      YVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA                      AALALTVDLPPASSEARNNSAFGFQGRLLHLSAGQRL                      GVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL                      PPSRSE</p>
59	cadena de botón de Fc de DP47 fusionada a 4-1BBL hu monomérico (71-254)	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW                      VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR                      NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW                      GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC                      LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY                      SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP                      KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS                      RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK                      KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV                      NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN                      QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV                      LLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH                      NHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAG                      LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS</p>

ES 2 998 140 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
60	di-mu4-1BBL-CL cadena de botón de Fc	véase la tabla 5
61	mono-mu4-1BBL-cadena de CH1	véase la tabla 5
62	CD19	N.º de acceso a UniProt P15391
63	CD20	N.º de acceso a UniProt P11836
64	VH de B-Ly1 anti-CD20 murino	GPELVKPGASVKISCKASGYAFSYSWMNWVKLRPG QGLEWIGRIFPGDGD TDYNGKFKGKATLTADKSSNT AYMQLTSLTSVDSAVYLCARNVFDGYWL VYWGQG TLVTVSA
65	VL de B-Ly1 anti-CD20 murino	NPVTLGTSASISCRSSKSLLSHNSGITYLYWYLQKPGQ SPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEA EDVGVYYCAQNLELPYTFGGGKLEIKR
66	4-1BBL de longitud completa	N.º de UniProt P41273
67	4-1BBL (50-254)	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL TQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
68	4-1BB humano	N.º de acceso a UniProt Q07011
69	4-1BB murino	N.º de acceso a UniProt P20334
70	4-1BB de macaco cangrejero	N.º de acceso a Uniprot F6W5G6
71	VH para 4-1BB (20H4.9)	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQSPEKGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRTISVD TSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDYGP GNYDWY FDLWGRGTLVTVSS
72	VL para 4-1BB (20H4.9)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGKVEIK
73	HCDR1 para CD20	YSWIN
74	HCDR2 para CD20	RIFPGDGD TDYNGKFK
75	HCDR3 para CD20	NVFDGYWL VY
76	LCDR1 para CD20	RSSKSLLSHNSGITYLY
77	LCDR2 para CD20	QMSNLVS
78	LCDR3 para CD20	AQNLELPYT
79	VH para CD20	QVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWIN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGT LVTVSS
80	VL para CD20	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNSGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGKVEIK RTV
81	conector peptídico G4S	GGGGS
82	(G4S) <sub>2</sub>	GGGGS GGGGS
83	(SG4) <sub>2</sub>	SGGGGS GGGG
84	conector peptídico	GGGGS GGGGS GGGG
85	conector peptídico	GSPGSSSSGS
86	conector peptídico (G4S) <sub>3</sub>	GGGGS GGGGS GGGGS <sub>3</sub>

ES 2 998 140 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
87	conector peptídico (G4S) <sub>4</sub>	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
88	conector peptídico	GSGSGSGS
89	conector peptídico	GSGSGNGS
90	conector peptídico	GGSGSGSG
91	conector peptídico	GGSGSG
92	conector peptídico	GGSG
93	conector peptídico	GGSGNGSG
94	conector peptídico	GGNGSGSG
95	conector peptídico	GGNGSG
96	CDR-H1 para FAP (28H1)	SHAMS
97	CDR-H2 para FAP (28H1)	AIWASGEQYYADSVKG
98	CDR-H3 para FAP (28H1)	GWLGNFYD
99	CDR-L1 para FAP (28H1)	RASQSVRSYLA
100	CDR-L2 para FAP (28H1)	GASTRAT
101	CDR-L3 para FAP (28H1)	QQGQVIPPT
102	CDR-H1 para FAP(4B9)	SYAMS
103	CDR-H2 para FAP(4B9)	AIIGSGASTYYADSVKG
104	CDR-H3 para FAP(4B9)	GWFGGFNY
105	CDR-L1 para FAP(4B9)	RASQSVRSYLA
106	CDR-L2 para FAP(4B9)	VGSRRAT
107	CDR-L3 para FAP(4B9)	QQGIMLPPT
108	VH para FAP(28H1)	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSW VRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFYD GQGTILVTVSS
109	VL para FAP(28H1)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWY QQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT SRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIK
110	VH para FAP(4B9)	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW GQGTILVTVSS
111	VL para FAP(4B9)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWY QQKPGQAPRLLINVGSRRTGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
112	cadena de ojal de Fc anti-FAP (4B9) (construcción 2.4)	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW GQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPAPEAAGGPPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALGAPIEKTKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
113	cadena ligera anti-FAP (4B9) (construcción 2.4)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWY QQKPGQAPRLLINVGSRRTGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

ES 2 998 140 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
114	cadena de ojal de Fc anti-FAP(28H1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSW VRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFYDW GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKQVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKN QVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSVGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
115	cadena ligera anti-FAP (28H1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWY QQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
116	cadena de ojal de Fc anti-FAP (4B9) fusionada a 4-1BBL hu dimérico (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKQVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKN QVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSVGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAG LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGG SREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDG PLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAEGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGL PSRSE

ES 2 998 140 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
117	cadena de botón de Fc anti-FAP (4B9) fusionada a 4-1BBL hu monomérico (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAG LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVGLFRVTPEIPAGLPSRSE
118	cadena de ojal de Fc anti-FAP (28H1) fusionada a 4-1BBL hu dimérico (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSW VRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAG LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGG SREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDG PLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEARNNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGL PSRSE
119	cadena de botón de Fc anti-FAP (28H1) fusionada a 4-1BBL hu monomérico (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSW

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		VRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFYDW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGREGPELSPDDPAG LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVGLFRVTPEIPAGLPSRSE
120	FAP humana (hu)	N.º de UniProt Q12884
121	ectodominio de FAP hu+marca poly-lys+marca his <sub>6</sub>	RPSRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFPPNWIS GQEYLHQADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNA SNYGLSPDRQFVYLESYSLWRYSYTATYYIYDLS NGEFVRGNEPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYL KQRPDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYEEEMLATK YALWWSPNGKFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYP RTINIPYPKAGAKNPVVRIFIIDTTYPAYVGPQEVVPP AMIASSDYFWSLWTWVTDERVCLQWLKRVQNVSVL SICDFREDWQTDWCPKTQEHIEESRTGWAGGFFVST PVFSYDAISYKIFSDKDGKHHIHYIKDTVENAIQITS GKWEAINIFRVTQDSLIFYSSNEFEEYPGRRNIYRISIGS YPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCY GPGIPISLHDGRTDQEIKILEENKELENALKNIQLPKE EIKKLEVDEITLWYKMLPPQFDRSKKYPLLIQVYGG PCSQSVRSVFAVNWISYLASKEGMVIALVDGRGTAF QGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQITAVRKFIEMGFIDE KRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGIAPVSS WEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAE YFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQV DFQAMWYSDQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFS LSDGKKKKKKGHHHHH
122	FAP de ratón	N.º de UniProt P97321
123	ectodominio de FAP murina+marca poly-lys+marca his <sub>6</sub>	RPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGTFSYKTYFPNWIS EQEYLHQSEDDNIVFYNIETRESYIILSNSTMKSVNAT DYGLSPDRQFVYLESYSLWRYSYTATYYIYDLQN GEFVRGYELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLK QRPDPPFQITYTGRENRIFNGIPDWVYEEEMLATKY ALWWSPDGKFLAYVEFNDSDIPIIAYSYYGDGQYPR TINIPYPKAGAKNPVVRVIVDTTYPHVGPMVEVPP EMIASSDYFWSLWTWSSERVCLQWLKRVQNVSVL SICDFREDWHAWECPKNQEHVEESRTGWAGGFFVST PAFSQDATSYKIFSDKDGKHHIHYIKDTVENAIQITS GKWEAIYIFRVTQDSLIFYSSNEFEGYPGRRNIYRISIG

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		NSPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFYSYKAKYYALVC YGPGLPISTLHDGRTDQEIQVLEENKELENSLRNIQLP KVEIKKLDGGLTFWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVY GGPCSQSVKSVFAVNWITYLASKEGIVIALVDGRGTA FQGDKFLHAVYRKLGVYEVEDQLTAVRKFIEMGFID EERIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGIAVAPVS SWEYYASISYSERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARA EYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQV DFQAMWYSDQNHGILSGRSQNHLYTHMTHFLKQCF SLSDGKKKKKKGGHHHHHH
124	ectodominio de FAP de macaco cangrejero+marca poly-lys+marca his6	RPPRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFPPNWIS GQEYLHQADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNA SNYGLSPDRQFVYLESDYSKLWRYSYTATYIYDLS NGEFVRGNELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYL KQRPDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYEEEMLATK YALWWSPNGKFLAYAEFNDDIPVIAYSYYGDEQYP RTINIPYPKAGAKNPFVRIFIIDTTYPAYVGPQEVVVP AMIASDDYFWSLWVTDERVCLQWLKRVQNVSVL SICDFREDWQIWDPCPKTQEHIEESRTGWAGGFVST PVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITS GKWEAINIFRVTQDSLFSYSSNEFEDYPGRRNIRISIG SYPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVC YGPGLPISTLHDGRTDQEIQVLEENKELENSLRNIQLP KVEIKKLEVDITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVY GGPCSQSVRSVFAVNWISYLASKEGMVIALVDGRGT AFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQITAVRKFIEMGFI DEKRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGIAVAP VSSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMA RAEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNA QVDFQAMWYSDQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQ CFSLSDGKKKKKKGGHHHHHH

La información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas se da en: Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpos se numeran y denominan de acuerdo con los sistemas de numeración de acuerdo con Kabat (Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) como se define anteriormente.

\*\*\*

## EJEMPLOS

### Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular ADN como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina humana se da en: Kabat, E.A. *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta ed., publicación NIH n.º 91-3242.

### Secuenciación de ADN

Se determinaron secuencias de ADN por secuenciación de doble hebra.

### Síntesis génica

Se generaron segmentos génicos deseados por PCR usando moldes apropiados o bien se sintetizaron por Genent AG (Ratisbona, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR por síntesis génica

automatizada. En casos donde no estaba disponible ninguna secuencia génica exacta, se diseñaron cebadores oligonucleotídicos en base a las secuencias de los homólogos más cercanos y se aislaron los genes por RT-PCR a partir del ARN que se origina del tejido apropiado. Se clonaron los segmentos génicos flanqueados por sitios de escisión de endonucleasas de restricción singulares en vectores de clonación/secuenciación estándar. Se purificó el ADN plasmídico a partir de bacterias transformadas y se determinó la concentración por espectroscopia UV. Se confirmó la secuencia de ADN de los fragmentos génicos subclonados por secuenciación de ADN. Se diseñaron segmentos génicos con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los respectivos vectores de expresión. Se diseñaron todas las construcciones con una secuencia de ADN del extremo 5' que codifica un péptido líder que selecciona como diana proteínas para su secreción en células eucariotas.

## Técnicas de cultivo celular

Se usaron técnicas de cultivo celular estándar como se describe en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

## Purificación de proteínas

Se purificaron proteínas a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados en referencia a protocolos estándar. En resumen, se aplicaron anticuerpos a una columna Sepharose de proteína A (GE Healthcare) y se lavaron con PBS. Se logró la elución de anticuerpos a pH 2,8 seguido de neutralización inmediata de la muestra. Se separó la proteína agregada de los anticuerpos monoméricos por cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200; GE Healthcare) en PBS o en histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0. Se combinaron las fracciones de anticuerpos monoméricos, se concentró (si se requirió) usando, por ejemplo, un concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), se congeló y se almacenó a -20 °C o -80 °C. Parte de las muestras se proporcionaron para posterior análisis de proteínas y caracterización analítica, por ejemplo, por SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o espectrometría de masas.

## SDS-PAGE

Se usó el sistema de gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se usó un 10 % o un 4-12 % de geles NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH 6,4) y un MES NuPAGE® (geles reducidos, con aditivo de tampón de migración NuPAGE® Antioxidant) o tampón de migración MOPS (geles no reducidos).

## Cromatografía de exclusión por tamaño analítica

Se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para la determinación de la agregación y del estado oligomérico de los anticuerpos por cromatografía HPLC. En resumen, se aplicaron anticuerpos purificados con proteína A a una columna Tosoh TSKgel G3000SW en NaCl 300 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7,5 en un sistema Agilent HPLC 1100 o a una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en 2 x PBS en un sistema Dionex HPLC. Se cuantificó la proteína eluida por absorbancia UV e integración de áreas de picos. BioRad Gel Filtration Standard 151-1901 sirvió como patrón.

## Determinación de la unión y afinidad de unión de anticuerpos multiespecíficos a los respectivos antígenos usando resonancia de plasmón superficial (RPS) (BIACORE)

La unión de los anticuerpos generados a los respectivos antígenos se investiga por resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). En resumen, para las mediciones de afinidad se inmovilizan anticuerpos anti-IgG humana de cabra, JIR 109-005-098, en un chip CM5 por medio de acoplamiento de amina para la presentación de los anticuerpos contra el respectivo antígeno. La unión se mide en tampón HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005 %, pH 7,4), 25 °C (o de forma alternativa a 37 °C). Se añadió antígeno (R&D Systems o purificado internamente) en diversas concentraciones en solución. Se midió la asociación por una inyección de antígeno de 80 segundos a 3 minutos; se midió la disociación lavando la superficie del chip con tampón HBS durante 3-10 minutos y se estimó el valor de KD usando un modelo de unión 1:1 de Langmuir. Se restan los datos de control negativo (por ejemplo, curvas de tampón) de las curvas de muestra para la corrección de la desviación de referencia intrínseca del sistema y para la reducción de la señal de ruido. Se usa el respectivo programa informático de evaluación de Biacore para el análisis de sensores y para el cálculo de datos de afinidad.

## Ejemplo 1

### Preparación, purificación y caracterización de moléculas de unión a antígeno 4-1BBL que comprenden al menos un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un antígeno asociado a tumor

Se prepararon moléculas de unión a antígeno de fusión a Fc que contienen un trímero de ligando para 4-1BB que selecciona como diana CD19 como se describe en la pub. de sol. de patente internacional n.º WO 2016/075278 A1.

En particular, se prepararon las siguientes moléculas:

a) Moléculas de unión a antígeno de fusión a Fc que contienen un trímero de ligando para 4-1BB que selecciona como diana y que no selecciona como diana CD19 monovalentes

Se subclonó una secuencia de ADN que codifica un ligando para 4-1BB dimérico fusionado al dominio CL humano sin cambio de pauta de lectura con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant, Zhu *et al.* 1998). Se fusionó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando para 4-1BB al dominio CH1 de IgG1 humana. En la construcción 3.4, para mejorar el emparejamiento correcto, se introdujeron adicionalmente las siguientes mutaciones en el CH-CL cruzado (variante cargada). En el ligando para 4-1BB dimérico fusionado al CL humano, E123R y Q124K, en el ligando para 4-1BB monomérico fusionado al CH1 humano, K147E y K213E.

Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican una proteína de unión específica para CD19, clon 8B8-018 o clon 8B8-2B11, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o bien la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala en la región constante de las cadenas pesadas de botón y ojal para anular la unión a los receptores gamma Fc de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico-botón de Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión a CH1 monomérico, la cadena de ojal de Fc anti-CD19 seleccionada como diana que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando para 4-1BB trimérico ensamblado y un Fab de unión a CD19 (**figuras 1A y 1B**). En consecuencia, se preparó una versión no seleccionada como diana reemplazando la proteína de unión para CD19 por DP47 de estirpe germinal (**figura 1C**).

**Tabla 1: Construcciones CD19-4-1BBL monovalentes usadas en los experimentos**

	Ejemplo en el documento WO 2016/075278	compuesto por
CD19(018)-4-1BBL mono (variante cargada)	Ejemplo 7.1.6 (construcción 3.4)	SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42
CD19(2B11)-4-1BBL mono (variante cargada)	Ejemplo 7.2.6 (construcción 4.4)	SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48 SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42
CD19(2B11)-4-1BBL mono	Ejemplo 7.2.7 (construcción 4.5)	SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48 SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44
DP47-4-1BBL mono no seleccionada como diana	Ejemplo 7.3.12 (control D)	SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44

b) Moléculas de unión a antígeno de fusión a Fc que contienen un trímero de ligando para 4-1BB que selecciona como diana y que no selecciona como diana CD19 bivalentes

Se subclonaron las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera de la cadena pesada y ligera específica de una proteína de unión específica para CD19, clon 8B8-018 o clon 8B8-2B11, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal, el botón o bien la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se introdujeron las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala en la región constante de las cadenas pesadas de botón y ojal para anular la unión a los receptores gamma Fc de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2012/130831. Además, se fusionó un polipéptido que comprendía dos ectodominios del ligando para 4-1BB al extremo C de la cadena de ojal de Fc de IgG1 humana y se fusionó un polipéptido que comprendía un ectodominio del ligando para 4-1BB al extremo C de la cadena de botón de Fc de IgG1 humana. La combinación de la cadena pesada de ligando dimérico-oyal de hulG1 anti-CD19 que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena pesada de ligando monomérico-botón de hulG1 anti-CD19 que contiene las mutaciones S354C/T366W y las cadenas ligeras anti-CD19 permitió la generación de un heterodímero, que incluía un ligando para 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fab de unión a CD19 (**figura 1D**). En consecuencia, se preparó una versión no seleccionada como diana reemplazando la proteína de unión para CD19 por DP47 de estirpe germinal (**figura 1E**).

**Tabla 2: Construcciones CD19-4-1BBL bivalentes usadas en los experimentos**

	Ejemplo en el documento WO 2016/075278	compuesto por
CD19(018)-4-1BBL bi	Ejemplo 7.1.8 (construcción 3.6)	2 x SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46
CD19(2B11)-4-1BBL bi	Ejemplo 7.2.8 (construcción 4.6)	2 x SEQ ID NO: 48 SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52

DP47-4-1BBL bi no seleccionada como diana	Ejemplo 7.3.12 (control C)	2 x SEQ ID NO: 57 SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59
---	----------------------------	---

La producción y caracterización de las moléculas de unión a antígeno de fusión a Fc que contienen un trímero de ligando para 4-1BB que selecciona como diana y que no selecciona como diana CD19 se describen en detalle en el documento WO 2016/075278, ejemplo 7.4 y ejemplos de 8 a 11, respectivamente.

5 También se prepararon moléculas de unión a antígeno de fusión a Fc que contienen un trímero de ligando para 4-1BB que selecciona como diana FAP como se describe en la pub. de sol. de patente internacional n.º WO 2016/075278 A1.

10 En particular, se prepararon las siguientes moléculas:

c) Moléculas de unión a antígeno de fusión a Fc que contienen un trímero de ligando para 4-1BB que selecciona como diana FAP monovalentes

15 Se subclonaron la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican una proteína de unión específica para FAP, clon 28H1 o clon 4B9, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o bien la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala en la región constante de las cadenas pesadas de botón y ojal para anular la unión a los receptores gamma Fc de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico-botón de Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión a CH1 monomérico, la cadena de ojal de Fc anti-FAP seleccionada como diana que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-FAP permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando para 4-1BB trimérico ensamblado y un Fab de unión a FAP (de forma análoga a la fig. 1A).

25 **Tabla 3: construcciones FAP-4-1BBL monovalentes**

	Ejemplo en el documento WO 2016/075278	compuesto por
FAP(4B 9)-4-1BBL mono (variante cargada)	Ejemplo 2.1.4 (construcción 2.4)	SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113 SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42
FAP(28H1)-4-1BBL mono	Ejemplo 1.1 (construcción 1.2)	SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115 SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44

d) Moléculas de unión a antígeno de fusión a Fc que contienen un trímero de ligando para 4-1BB que selecciona como diana FAP bivalentes

30 Se subclonaron las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera de la cadena pesada y ligera específica de una proteína de unión específica para FAP, clon 28H1 o clon 4B9, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal, el botón o bien la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se introdujeron las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala en la región constante de las cadenas pesadas de botón y ojal para anular la unión a los receptores gamma Fc de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2012/130831. Además, se fusionó un polipéptido que comprendía dos ectodominios del ligando para 4-1BB al extremo C de la cadena de ojal de Fc de IgG1 humana y se fusionó un polipéptido que comprendía un ectodominio del ligando para 4-1BB al extremo C de la cadena de botón de Fc de IgG1 humana. La combinación de la cadena pesada de ligando dimérico-oyal de hulgG1 anti-FAP que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena pesada de ligando monomérico-botón de hulgG1 anti-FAP que contiene las mutaciones S354C/T366W y las cadenas ligeras anti-FAP permitió la generación de un heterodímero, que incluía un ligando para 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fab de unión a FAP (**figura 1D**).

45 **Tabla 4: Construcciones FAP-4-1BBL bivalentes**

	Ejemplo en el documento WO 2016/075278	compuesto por
FAP(4B 9)-4-1BBL bi	Ejemplo 2.1.3 (construcción 2.3)	2 x SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 117
FAP(28H1)-4-1BBL bi	Ejemplo 1.1 (construcción 1.5)	2 x SEQ ID NO: 115 SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 119

La producción y caracterización de las moléculas de unión a antígeno de fusión a Fc que contienen un trímero de ligando para 4-1BB que selecciona como diana FAP se describen en detalle en el documento WO 2016/075278, ejemplos de 1 a 6, respectivamente.

50 **Ejemplo 2**

**Preparación, purificación y caracterización de la molécula de unión a antígeno CD19-mu4-1BBL monovalente (sustituto híbrido)**

- 5 Se preparó una molécula de unión a antígeno de fusión a Fc que contiene un trímero de ligando para 4-1BB murino que selecciona como diana CD19 como se describe en la pub. de sol. de patente internacional n.º WO 2016/075278 A1. La secuencia de ADN que codifica parte del ectodominio (aminoácido 104-309, incluyendo la mutación C160S) del ligando para 4-1BB de ratón se sintetizó de acuerdo con la secuencia Q3U1Z9-1 de la base de datos Uniprot.
- 10 Se subclonó una secuencia de ADN que codifica el ligando para 4-1BB murino dimérico fusionado al dominio CL humano sin cambio de pauta de lectura con los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG1 humana en el botón (Merchant, Zhu *et al.* 1998). Se fusionó un polipéptido que contenía un ectodominio del ligando para 4-1BB murino al dominio CH1 de IgG1 humana. Se subclonó la región variable de secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera que codifican una proteína de unión específica para CD19, clon 8B8-018, sin cambio de pauta de lectura con la cadena pesada constante del ojal o bien la cadena ligera constante de IgG1 humana. Se han introducido las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala en la región constante de las cadenas pesadas de botón y ojal para anular la unión a los receptores gamma Fc de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico-botón de Fc que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión a CH1 monomérico, la cadena de ojal de Fc anti-CD19 seleccionada como diana que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando para 4-1BB murino trimérico ensamblado y un Fab de unión a CD19 (**figura 1F**).
- 15
- 20
- 25 Las secuencias de aminoácidos para el sustituto híbrido CD19-mu4-1BBL se pueden encontrar en la **tabla 5**.

**Tabla 5: secuencias de aminoácidos del sustituto híbrido maduro CD19-mu4-1BBL**

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
60	di-mu4-1BBL-CL cadena de botón de Fc	RTEPRPALTTTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGCPNTTQQGS PVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHWSQDGAGSSYLSQGLRYEE DKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPTFTNTGHKVVQGWVSLVL QAKPQVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLLK AGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTTSFGLFLVK PDNPWEGGGGSGGGGSRTTEPRPALTTTSPNLGTRENNAD QVTPVSHIGCPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLSNTTLNWH SQDGAGSSYLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLS PTFTNTGHKVVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFPCS MENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQDAYR DWELSYPNNTTSFGLFLVKPDNPWEGGGGSGGGGSRTVAA PSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
61	mono-mu4-1BBL-cadena de CH1	RTEPRPALTTTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGCPNTTQQGS PVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHWSQDGAGSSYLSQGLRYEE DKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPTFTNTGHKVVQGWVSLVL QAKPQVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLLK AGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTTSFGLFLVK PDNPWEGGGGSGGGGSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTOTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC

33	cadena de ojal de Fc anti-CD19(8B 8-018)	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDTYIMHWVRQ                  APGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFGQGRVTMTSDTSISTA                  YMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVT                  VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT                  VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ                  TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG                  GPSVFLFPPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW                  YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN                  GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRD                  ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP                  VLDSGDGSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH                  YTQKSLSLSPGK</p>
34	cadena ligera anti-CD19(8B 8-018)	<p>DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNTYLNWY                  LOKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISR                  EAEDVGVVYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP                  PSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGN                  SQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTH                  QGLSSPVTKSFNRGEC</p>

El sustituto híbrido CD19-mu4-1BBL se produjo cotransfectando células CHO-K1 que crecían en suspensión con los vectores de expresión de mamífero usando eviFect (Evitria AG). Las células se transfectaron con los correspondientes vectores de expresión en una proporción 1:1:1 ("vector de cadena pesada de ojal de Fc": "vector de cadena ligera para CD19": "vector de 4-1BBL-cadena pesada de botón de Fc": "vector de mu4-1BBL-cadena ligera"). Para la transfección, se cultivan células CHO-K1 en suspensión libre de suero en medio de cultivo eviMake (Evitria AG). Después de 7 días a 37 °C en una estufa de incubación con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %, se recoge el sobrenadante del cultivo para su purificación por centrifugación y la solución se filtra de forma estéril (filtro de 0,22 mm) y se mantiene a 4 °C. Las proteínas secretadas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular por cromatografía de afinidad usando proteína A, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, el sobrenadante se cargó en una columna MabSelectSure de proteína A (GE Healthcare) equilibrada con fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. La proteína no unida se retiró lavando con tampón que contenía fosfato de sodio 20 mM y citrato de sodio 20 mM (pH 7,5). La proteína unida se eluyó usando un gradiente de pH lineal de cloruro de sodio de citrato de sodio 20 mM, NaCl 100 mM, glicina 100 mM, Tween20 al 0,01%, pH 3,0. A continuación, se lavó la columna con citrato de sodio 20 mM, NaCl 100 mM, glicina 100 mM, Tween20 al 0,01%, pH 3,0. El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/40 (v/v) de Tris 2 M, pH 8,0. La proteína se concentró y se filtró antes de cargarse en una columna HiLoad Superdex (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, NaCl 140 mM, Tween20 al 0,01%, pH 6,0.

La concentración de proteína de las construcciones bispecíficas purificadas se determinó midiendo la DO a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos. La pureza y el peso molecular de las construcciones bispecíficas se analizaron por CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor (Invitrogen, EE. UU.) usando un LabChipGXII (Caliper). El contenido agregado de construcciones bispecíficas se analizó usando una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en un tampón de migración K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM, NaCl 125 mM, monohidrógeno de L-arginina 200 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,02 % (p/v), a pH 6,7 a 25 °C.

**Tabla 6:** análisis bioquímico del sustituto híbrido CD19-mu4-1BBL

Molécula	Monómero [%]	Rendimiento [mg/l]	CE-SDS (sin rojo)
CD19-mu4-1BBL	99	3,5	92

**Caracterización funcional del sustituto híbrido CD19-mu4-1BBL por resonancia de plasmón superficial:**

La capacidad de unir simultáneamente 4-1BB murino-Fc(kih) y CD19 humano se evaluó por resonancia de plasmón superficial (RPS). Todos los experimentos de RPS se realizaron en un Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de migración (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo/Alemania). Se acopló directamente 4-1BB murino-Fc(kih) biotinilada a una cubeta de lectura de un chip de sensor de estreptavidina (SA). Se usaron niveles de inmovilización de hasta 600 unidades de resonancia (UR). La construcción mu4-1BBL que selecciona como diana CD19 se pasó a un intervalo de concentración de 200 nM con un flujo de 30 µl/minuto a través de las cubetas de lectura durante 90 segundos y la disociación se ajustó a cero s. Se inyectó CD19-Fc(kih) humano monomérico como segundo analito con un flujo de 30 µl/minuto a través de las cubetas de lectura durante 90 segundos a una concentración de 500 nM (**figura 2A**).

Se supervisó la disociación durante 120 segundos. Las diferencias en el índice de refracción aparente se corrigieron sustrayendo la respuesta obtenida en una cubeta de lectura de referencia, donde no se inmovilizó ninguna proteína. Como se puede observar en el gráfico de la **figura 2B**, el sustituto híbrido CD19-mu4-1BBL se puede unir simultáneamente a 4-1BB murino y CD19 humano.

### Ejemplo 3

#### Politerapia de CD19-4-1BBL y rituximab u obinutuzumab *in vitro*

##### Activación de linfocitos NK

CD19-4-1BBL está activa cuando se puede reticular en células de LNH que expresan CD19. Los anticuerpos tales como rituximab u obinutuzumab (Gazyva) se unen a CD20 en células de LNH y, de este modo, pueden activar los linfocitos NK para mediar en la ADCC. Los linfocitos NK activados expresan 4-1BB. La hipótesis es que CD19-4-1BBL puede sinergizar con anticuerpos que median en la ADCC anti-CD20 para la activación de linfocitos NK. Para someter a prueba esto, se usaron 3 líneas celulares de LNH diferentes, por ejemplo, WSU-DLCL2 (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>alta</sup>), SU-DHL-8 (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>baja</sup>) y Nalm-6 (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>baja</sup>). Para medir la actividad biológica de los linfocitos NK activados, se incubaron las respectivas células de LNH con PBMC purificados a partir de sangre roja y sana en una proporción de 1:25 durante 24 horas en presencia de rituximab u obinutuzumab valorado conforme a la dosis en solitario, o añadiendo CD19-4-1BBL valorada conforme a la dosis encima de la concentración CE<sub>50</sub> de rituximab u obinutuzumab, en medio IMDM (Gibco, n.º de cat. 31980-048) + FBS al 10 % (Gibco, n.º de cat. 16140-071) y penicilina-estreptomomicina al 1 % (Gibco, n.º de cat. 15070-063). Los sobrenadantes se recogieron para la medición de IFN- $\gamma$  por ELISA (kit de ELISA DuoSet Human IFN- $\gamma$ , R&D Systems, n.º de cat. DY285). La **figura 3** muestra que en las tres líneas celulares de LNH sometidas a prueba, CD19-4-1BBL pudo promover la función efectora de los linfocitos NK para la producción de IFN- $\gamma$  que se activaron por rituximab u obinutuzumab (Gazyva). En células CD20<sup>baja</sup> tales como SU-DHL-8 y Nalm-6, la combinación con obinutuzumab indujo mayor producción de IFN- $\gamma$  que la combinación con rituximab.

Para confirmar que CD19-4-1BBL solo puede activar los linfocitos NK después de la adición de anticuerpos que median en la ADCC, se midieron los marcadores de activación, tales como CD25 en linfocitos NK (seleccionados en CD3<sup>+</sup>CD56<sup>disim.</sup>). De forma consecuente con la producción de IFN- $\gamma$ , CD19-4-1BBL solo pudo promover la activación de linfocitos NK por regulación por incremento de CD25 que ya estaban activados por rituximab u obinutuzumab (**figura 4**). Por el contrario, los linfocitos T (tanto CD4 como CD8) no mostraron ninguna activación en términos de CD25 o CD69 en este cocultivo (datos no mostrados).

También se estudió si la CD19-4-1BBL seleccionada como diana es superior al anticuerpo agonista de 4-1BB urelumab para sinergizar la función ADCC de los linfocitos NK con obinutuzumab. En un experimento similar al que se hizo anteriormente, se observó que solo la combinación de CD19-4-1BBL con obinutuzumab promovía la activación de linfocitos NK (regulación por incremento de CD25), pero no la combinación de urelumab con obinutuzumab (**figura 5**).

### Ejemplo 4

#### Politerapia de CD19-4-1BBL híbrida y rituximab *in vivo*

La primera prueba de concepto para la combinación de CD19-4-1BBL híbrida (CD19-mu4-1BBL monovalente) y rituximab se llevó a cabo en ratones Scid huCD16Tg que portaban tumores.

Se obtuvieron células WSU-DLCL2 (linfoma difuso de linfocitos B grandes humano) originalmente de ECACC (European Collection of Cell Culture) y después de la expansión se depositaron en el banco de células interno de Roche Glycart AG. Las células se cultivaron en RPMI que contenía FCS al 10 % y 1x Glutamax. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO<sub>2</sub> al 5 %. Se inyectaron s.c. 1,5 x10<sup>6</sup> células por animal en el costado derecho de los animales en medio de cultivo celular con RPMI (Gibco) y Matrigel GFR (1:1, volumen total de 100  $\mu$ l) a una viabilidad de > 95,0 %.

Los ratones SCID transgénicos para Fc $\gamma$ R11a (CD16) humano (que expresan tanto macrófagos murinos positivos para Fc $\gamma$ R1V como linfocitos NK murinos transgénicos positivos para Fc $\gamma$ R11a humano como efectores) de 8-10 semanas de edad al inicio del experimento (criados en Charles River, Francia) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con directrices comprometidas (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo del estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local. Después de su llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento de salud continuo con regularidad.

De acuerdo con el protocolo (figura 6), a los ratones Scid huCD16Tg hembra se les inyectaron s.c. células tumorales como se describe anteriormente y se trataron una vez a la semana con los compuestos o PBS (vehículo) cuando el tamaño tumoral alcanzó aprox. 200 mm<sup>3</sup> (día 13). A todos los ratones se les inyectaron i.v. 200  $\mu$ l de la

solución apropiada una vez por semana. Para obtener la cantidad apropiada de compuestos por 200  $\mu$ l, las soluciones madre (tabla 5) se diluyeron con PBS cuando fue necesario. Para la politerapia (grupo D, figura 6) con rituximab y construcción CD19-4-1BBL híbrida, se inyectaron los tratamientos con un espacio de un día. El crecimiento tumoral se midió dos veces a la semana usando un calibrador y se calculó el volumen tumoral como sigue:

$$T_v: (W^2/2) \times L \quad (W: \text{ancho}, L: \text{largo})$$

El estudio se finalizó y todos los ratones se sacrificaron después de ocho inyecciones de los compuestos (día 64 después de la inyección de células tumorales) y los tumores se explantaron y pesaron. Las figuras 7A y 7B muestran la cinética del crecimiento tumoral (media  $\pm$  EEM) en todos los grupos de tratamiento, así como los pesos tumorales al finalizar el estudio. La monoterapia de la CD19-4-1BBL híbrida no reveló ninguna inhibición del crecimiento tumoral. La monoterapia de rituximab indujo un crecimiento tumoral más lento en comparación con el vehículo. Sin embargo, la combinación de rituximab y CD19-4-1BBL híbrida indujo una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa y reveló un peso tumoral significativamente menor al finalizar el estudio en comparación con todos los demás grupos de tratamiento.

**Tabla 7: composiciones usadas en el experimento *in vivo***

Compuesto	Tampón de formulación	Concentración (mg/ml)
CD19-4-1BBL híbrida	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	4,11 (= solución madre)
Rituximab	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	10 (= solución madre)

### Ejemplo 5

#### Politerapia de CD19(2B11)-4-1BBL monovalente y obinutuzumab (Gazyva) *in vivo*

La prueba de concepto para la combinación de CD19(2B11)-4-1BBL mono y GAZYVA se llevó a cabo en ratones NSG completamente humanizados.

Se obtuvieron células WSU-DLCL2 (linfoma difuso de linfocitos B grandes humano) originalmente de ECACC (European Collection of Cell Culture) y después de la expansión se depositaron en el banco de células interno de Roche Glycart AG. Las células se cultivaron en RPMI que contenía FCS al 10 % y 1x Glutamax. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO<sub>2</sub> al 5 %. Se inyectaron s.c. 1,5 x 10<sup>6</sup> células (pase *in vitro* 18) por animal en el costado derecho de los animales en medio de cultivo celular con RPMI (Gibco) y Matrigel GFR (1:1, volumen total de 100  $\mu$ l) a una viabilidad de > 95,0 %.

Se mantuvieron ratones NOD/Shi-scid/IL-2R $\gamma$  null (NSG) hembra de 4-5 semanas de edad al inicio del experimento (criados en Taconic, Dinamarca) en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con directrices comprometidas (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo del estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local (ZH193/2014). Después de su llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento de salud continuo con regularidad.

De acuerdo con el protocolo (**figura 8**), a los ratones NSG hembra se les inyectaron i.p. 15 mg/kg de busulfano seguido un día más tarde de una inyección i.v. de 1x10<sup>5</sup> células madre hematopoyéticas humanas aisladas de sangre del cordón umbilical. En la semana 14-16 después de la inyección de células madre, se extrajo sangre de los ratones por vía sublingual y se analizó la sangre por citometría de flujo para determinar la humanización satisfactoria. Los ratones injertados eficazmente se aleatorizaron de acuerdo con sus frecuencias de linfocitos T humanos en los diferentes grupos de tratamiento (figura 8, n: 10/grupo). En ese momento, a los ratones se les inyectaron s.c. células tumorales como se describe anteriormente y se trataron una vez a la semana con los compuestos o PBS (vehículo) cuando el tamaño tumoral alcanzó aprox. 450 mm<sup>3</sup> (día 11). A todos los ratones se les inyectaron i.v. 200  $\mu$ l de la solución apropiada. Para obtener la cantidad apropiada de compuestos por 200  $\mu$ l, las soluciones madre (tabla 6) se diluyeron con PBS cuando fue necesario. Para politerapias (grupo D, figura 8) con GAZYVA, se inyectó de forma concomitante la construcción CD19-4-1BBL. El crecimiento tumoral se midió dos veces a la semana usando un calibrador y se calculó el volumen tumoral como sigue:

$$T_v: (W^2/2) \times L \quad (W: \text{ancho}, L: \text{largo})$$

La **figura 9** muestra la cinética del crecimiento tumoral (media  $\pm$  EEM) en todos los grupos de tratamiento. No se pudieron detectar efectos monoterápicos de CD19-4-1BBL. Obinutuzumab, como único agente, indujo poca inhibición del crecimiento tumoral; sin embargo, la combinación con CD19-4-1BBL indujo una regresión tumoral completa en todos los animales (figura 9).

**Tabla 8: composiciones usadas en este experimento**

Compuesto	Tampón de formulación	Concentración (mg/ml)
CD19 (2B11)-4-1BBL mono	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	5,16 (= solución madre)
obinutuzumab (Gazyva)	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	25 (= solución madre)

\*\*\*

## REIVINDICACIONES

1. Un agonista de 4-1BB (CD137) para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno proliferativo de linfocitos B, en el que el agonista de 4-1BB se usa en combinación y de forma concomitante con un anticuerpo anti-CD20 seleccionado de rituximab u obinutuzumab,
- 5 en el que:
- (a) dicho trastorno proliferativo de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en linfoma no hodgkiniano (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de la zona marginal (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH); y
- 10 (b) dicho agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende
- 15 (i) un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19,
- (ii) un primer y un segundo polipéptido que están enlazados entre sí por un enlace disulfuro, y
- 20 (iii) un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración EU); y
- (c) dicho primer polipéptido comprende dos ectodominios de 4-1BBL que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 que están conectados entre sí por un conector peptídico y dicho segundo polipéptido comprende un ectodominio de 4-1BBL que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
- 25
2. El agonista de 4-1BB para su uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agonista de 4-1BB y el anticuerpo anti-CD20 se administran juntos en una única composición o se administran por separado en dos composiciones diferentes.
- 30
3. El agonista de 4-1BB para su uso en un procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que los ectodominios de 4-1BBL comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5.
- 35
4. El agonista de 4-1BB para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende (a) una región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>CD19) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y una región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>CD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, o (b) una región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>CD19) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y una región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>CD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 40
- 45
- 50
5. El agonista de 4-1BB para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o en el que el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>CD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.
- 55
6. El agonista de 4-1BB para su uso en un procedimiento de la reivindicación 5, en el que
- 60 (a) el dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD19 es un Fab, y
- (b) dicho primer polipéptido como se define en la reivindicación 1b(ii) comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32.
- 65

7. El agonista de 4-1BB para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.
8. El agonista de 4-1BB para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la combinación se administra de forma concomitante a intervalos de aproximadamente una semana a tres semanas.
9. El agonista de 4-1BB para su uso en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se realiza un pretratamiento con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferentemente obinutuzumab, antes de la politerapia, en el que el periodo de tiempo entre el pretratamiento y la politerapia es suficiente para la reducción de los linfocitos B en el individuo en respuesta al anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferentemente obinutuzumab.
10. Una composición farmacéutica que comprende
- un agonista de 4-1BB como se define en la reivindicación 1, y
  - un anticuerpo anti-CD20 seleccionado de rituximab u obinutuzumab,
- en la que el agonista de 4-1BB y el anticuerpo anti-CD20 se administran juntos en una única composición.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 para su uso como medicamento.
12. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 10 u 11 para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo de linfocitos B seleccionado del grupo que consiste en linfoma no hodgkiniano (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de la zona marginal (LZM), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (LH).
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, o la composición para el uso de la reivindicación 11 o reivindicación 12, en la que el agonista de 4-1BB es una molécula de unión a antígeno que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

Fig. 1

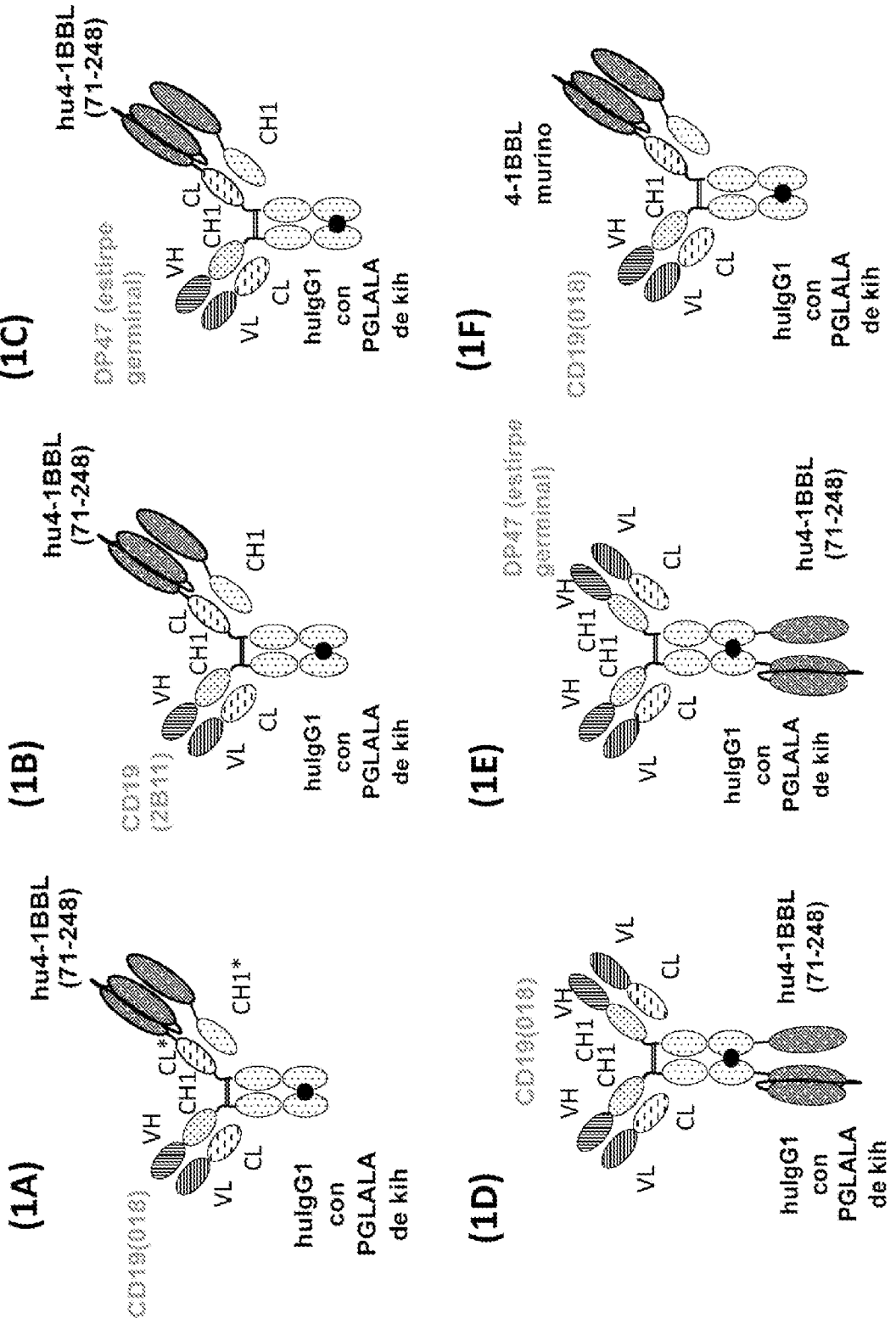
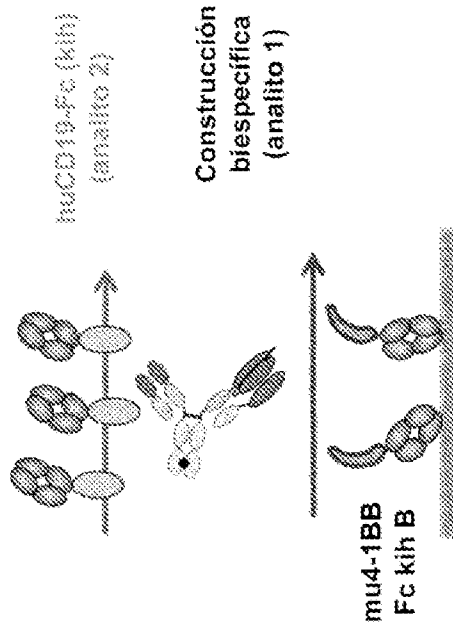


Fig. 2

(2A)



(2B)

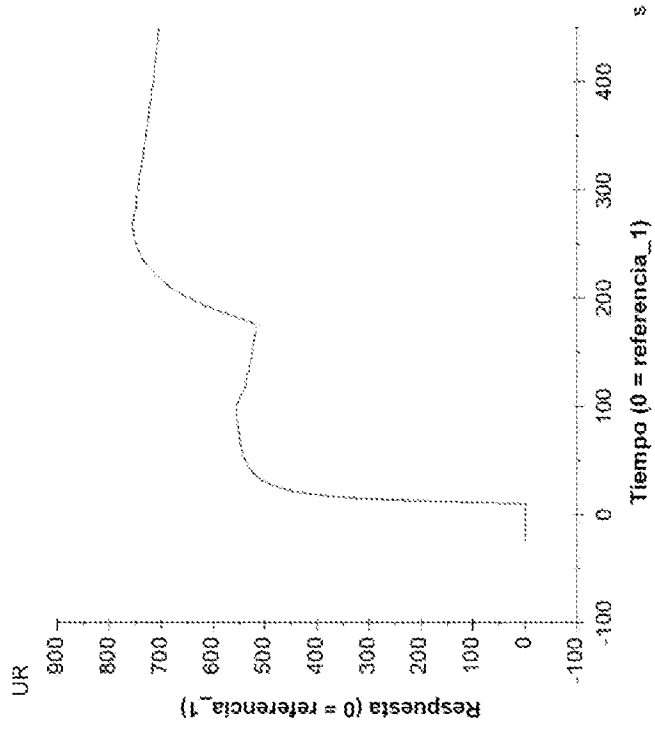
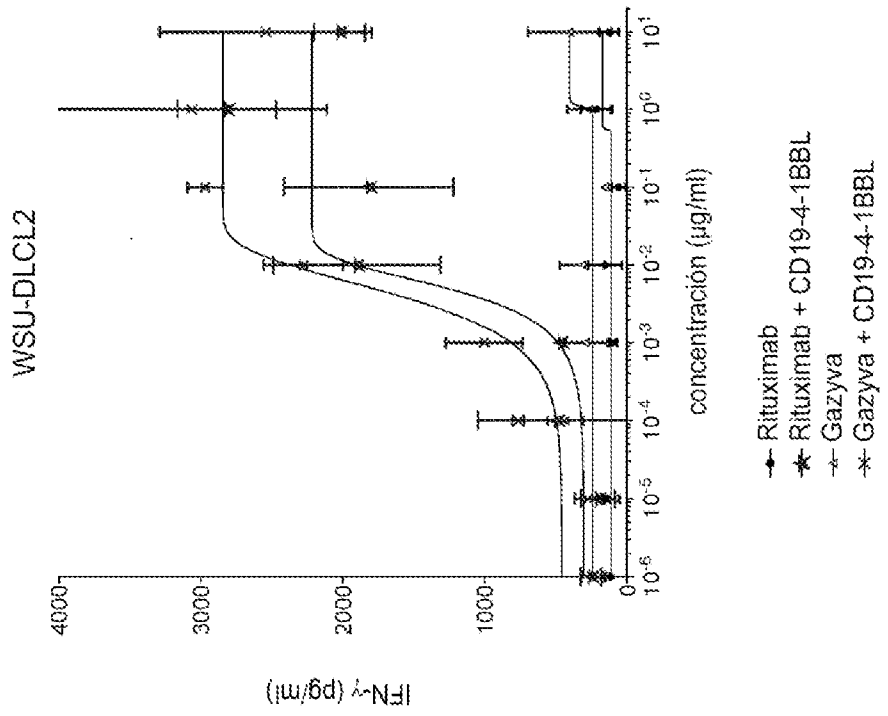


Fig. 3

(3A)



(3B)

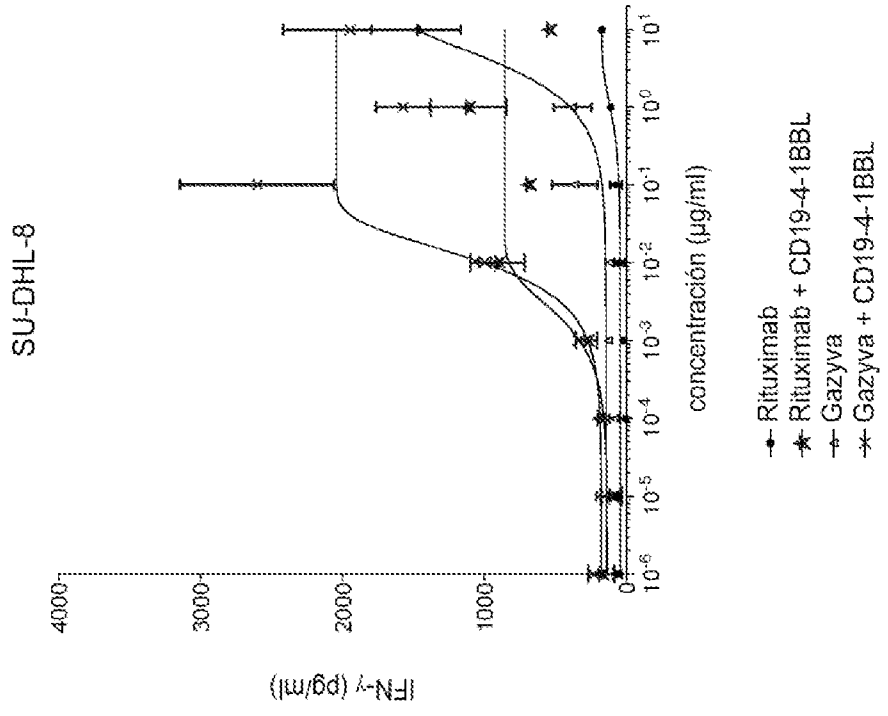


Fig. 3

(3C)

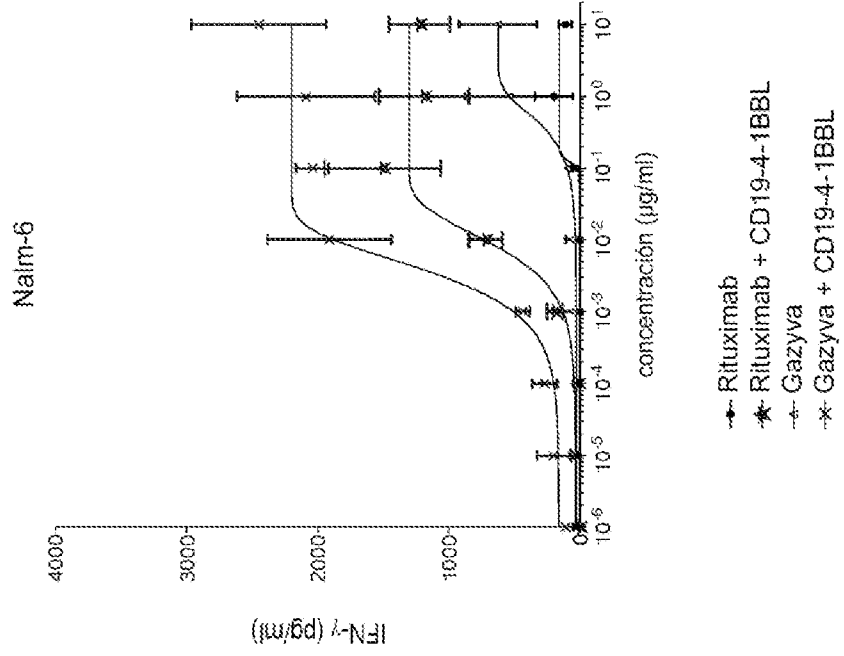


Fig. 4

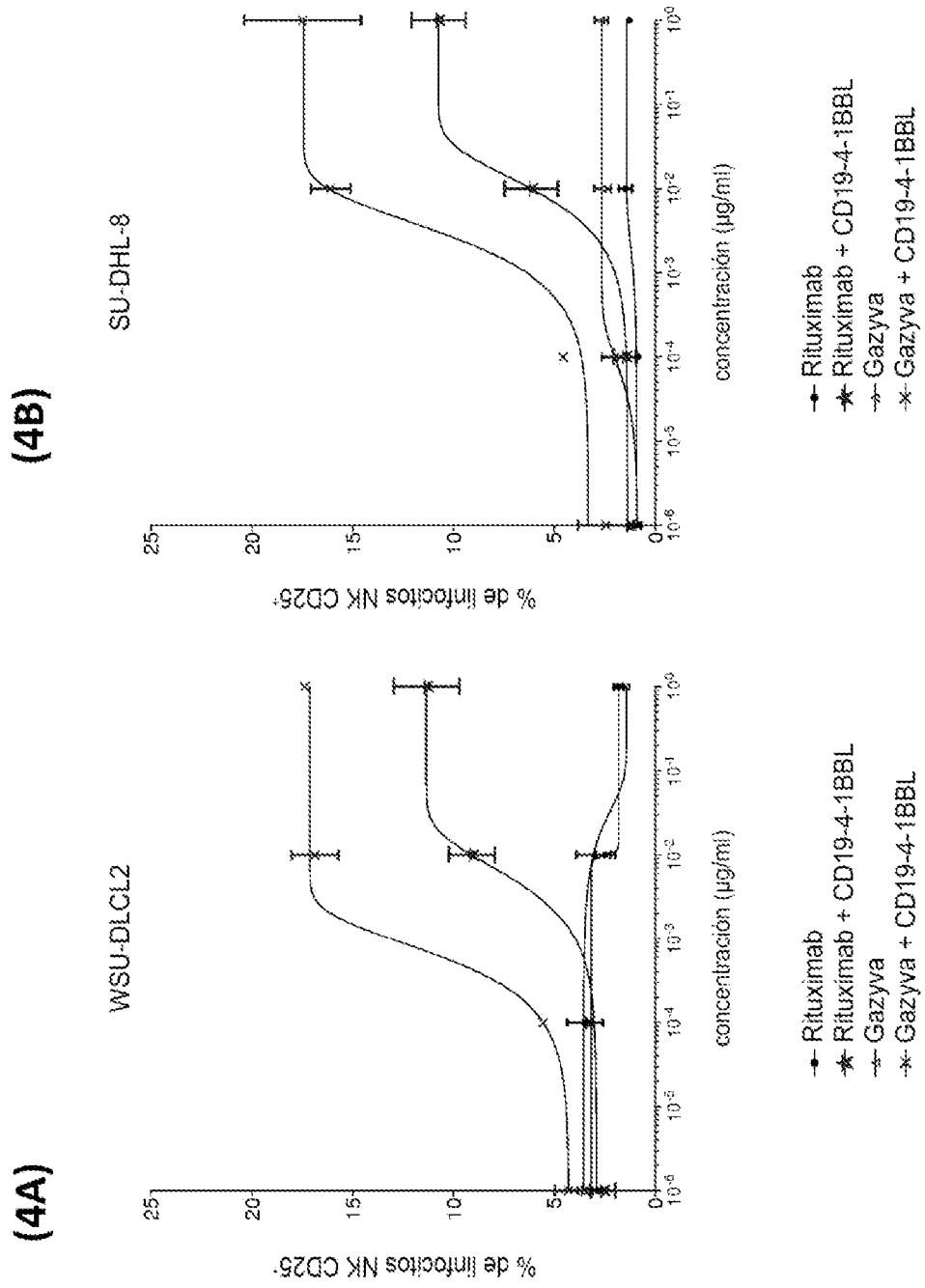


Fig. 4

(4C)

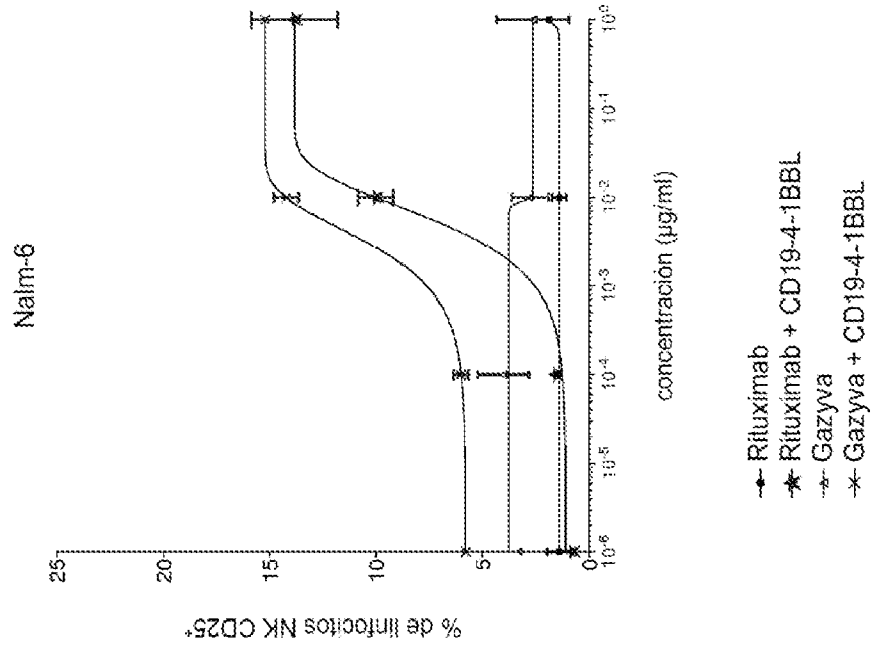
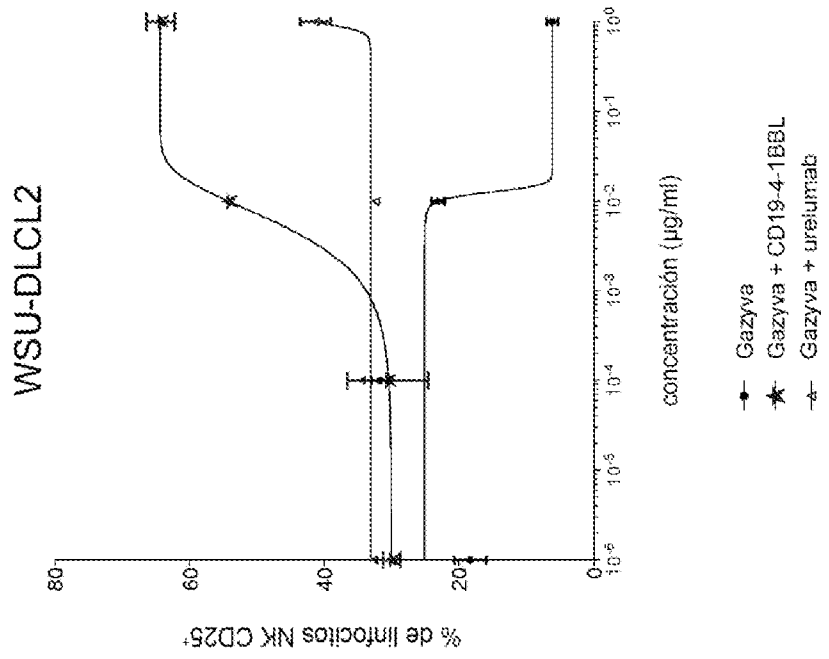


Fig. 5

(5A)



(5B)

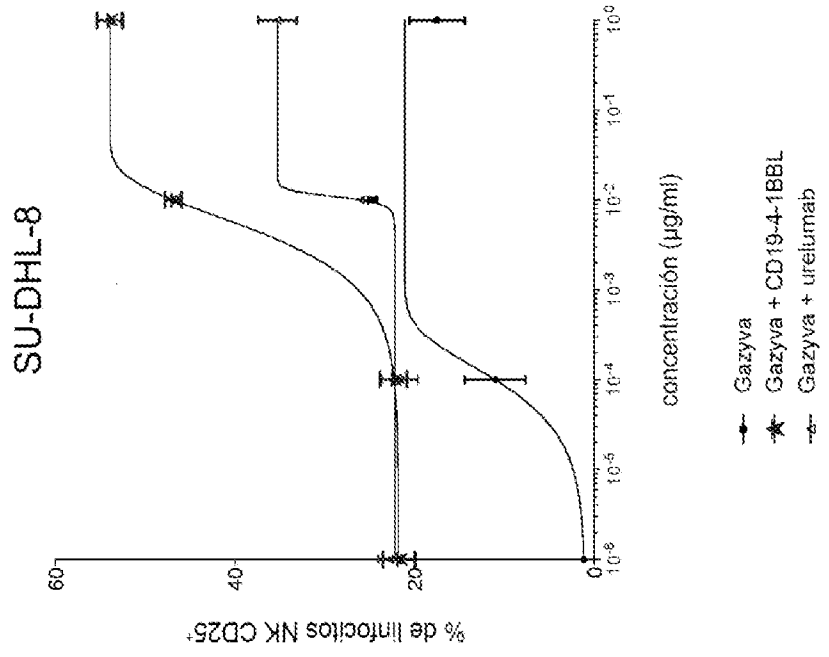


Fig. 5

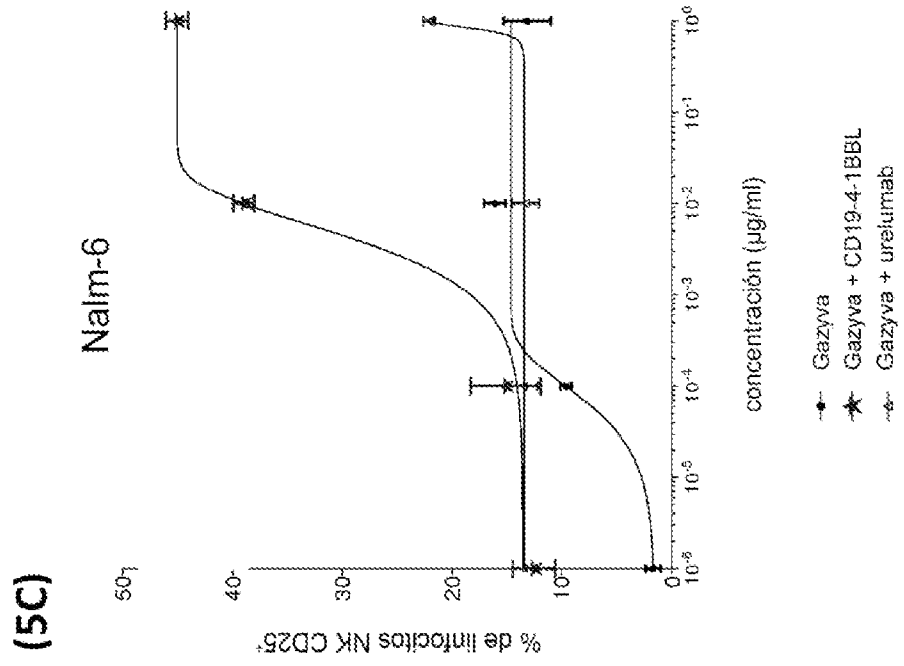
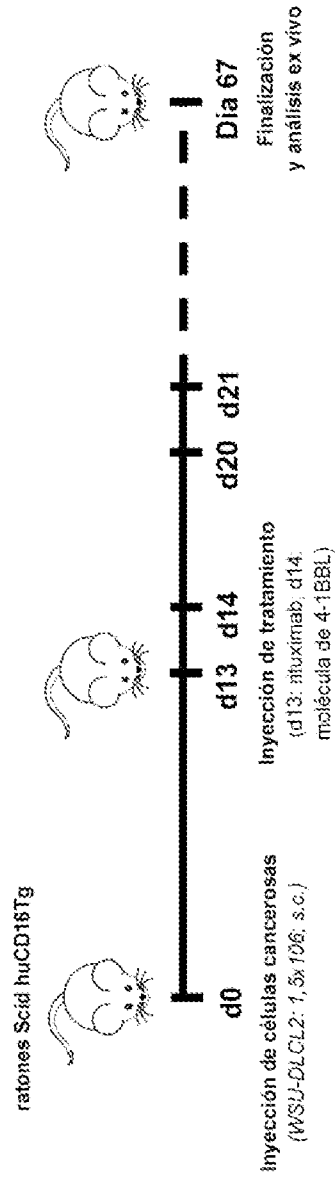


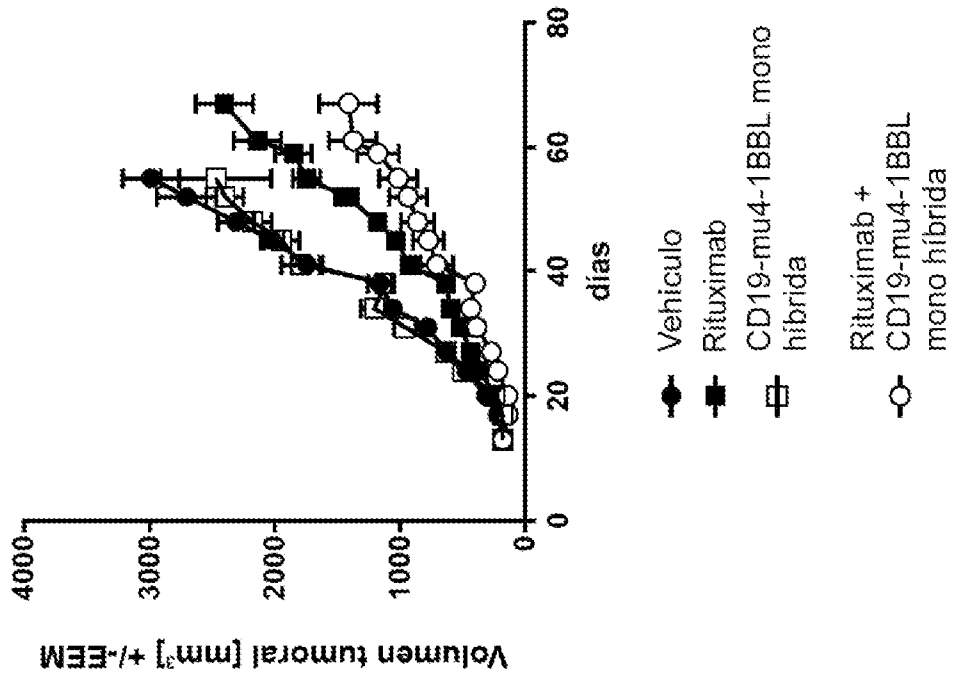
Fig. 6



Grupo	N.º de animales	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía de administración (tratamiento)	N.º de tratamientos
A	10	Vehículo	--	i.v.	8 (una vez a la semana)
B	10	Rituximab	10	i.v.	8 (una vez a la semana)
C	10	CD19-mu4-1BBL mono híbrida	3	i.v.	8 (una vez a la semana)
D	10	Rituximab + CD19-mu4-1BBL mono híbrida	10 / 3	i.v.	8 (una vez a la semana)

Fig. 7

(7A)



(7B)

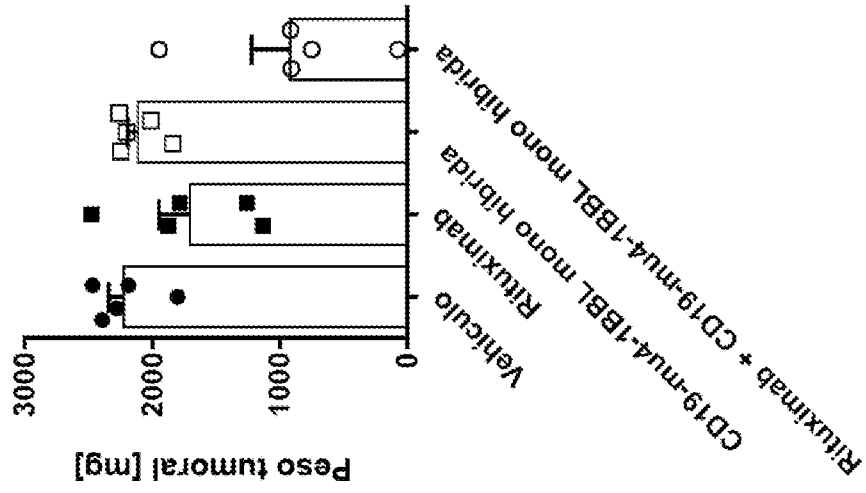
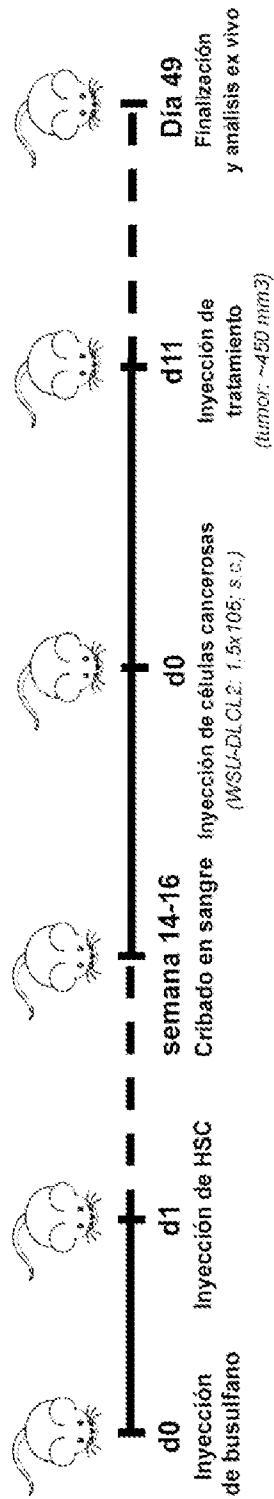


Fig. 8



Grupo	N.º de animales	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía de administración (tratamiento)	N.º de tratamientos
A	10	Vehículo	-	i.v.	6 (una vez por semana)
B	10	CD19 (2B11)-4-1BBL mono	3	i.v.	6 (una vez por semana)
C	10	GAZYVA	10	i.v.	6 (una vez por semana)
D	10	GAZYVA + CD19 (2B11)-4-1BBL mono	10 / 3	i.v.	6 (una vez por semana)

Fig. 9

