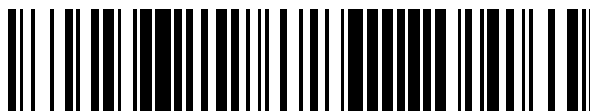


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 067**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 14161122 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 2786762**

54 Título: **Diacuerpos covalentes y usos de los mismos**

30 Prioridad:

19.12.2008 US 139352 P

27.02.2009 US 156035 P

30.10.2009 US 256779 P

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

27.11.2019

73 Titular/es:

MACROGENICS, INC. (100.0%)

9704 Medical Center Drive

Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

JOHNSON, LESLIE S. y

HUANG, LING

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 733 067 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

Diacuerpos covalentes y usos de los mismos

1. Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a moléculas de diacuerpo, mencionadas de otro modo "reactivos de redirección de afinidad doble ("DART"). Las moléculas de diacuerpo de la divulgación comprenden al menos dos cadenas polipeptídicas que se asocian para formar al menos dos sitios de unión a epítipo, que pueden reconocer epítopos iguales o diferentes. Adicionalmente, los epítopos pueden ser de la misma molécula o moléculas diferentes o estar ubicados en la misma célula o células diferentes. Las cadenas polipeptídicas individuales de la molécula de diacuerpo pueden unirse covalentemente mediante enlaces no peptídicos, enlaces covalentes tales como, aunque sin limitación, uniones disulfuro de restos de cisteína ubicados dentro de cada cadena polipeptídica. En realizaciones particulares, las moléculas de diacuerpo de la presente divulgación comprenden además una región Fc, que permite la funcionalidad de tipo anticuerpo a manipular en la molécula.

2. Antecedentes de la invención

El diseño de diacuerpos covalentes se basa en la construcción Fv monocatenaria (scFv) (Holliger *et al.* (1993) "*Diabodies: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448). En una IgG no modificada intacta los dominios VL y VH están ubicados en diferentes cadenas polipeptídicas, es decir, la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente. La interacción de una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo y, en particular la interacción de los dominios VL y VH forma uno de los sitios de unión a epítipo del anticuerpo. Por el contrario, la construcción scFv comprende un dominio VL y VH de un anticuerpo contenido en única cadena polipeptídica, en la que los dominios están separados por un conector flexible de longitud suficiente para permitir el autoensamblaje de los dos dominios en un sitio de unión a epítipo funcional. Cuando es imposible su autoensamblaje debido a un conector de longitud insuficiente (menos de aproximadamente 12 restos de aminoácidos), dos de las construcciones scFv interactúan entre sí para formar una molécula bivalente, asociándose el VL de una cadena con el VH de la otra (revisado en Marvin *et al.* (2005) "*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*," Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Además, se ha demostrado que la adición de un resto de cisteína al extremo C de la construcción permite la unión por disulfuro de las cadenas polipeptídicas, que estabiliza el dímero resultante sin interferir en las características de unión de la molécula bivalente (véase, por ejemplo, Olafsen *et al.* (2004) "*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27). Además, cuando se seleccionan dominios VL y VH de diferente especificidad, puede construirse no solamente una molécula bivalente, sino también biespecífica.

Los diacuerpos bivalentes tienen aplicaciones de amplio espectro incluyendo tratamiento e inmunodiagnóstico. La bivalencia permite una gran flexibilidad en el diseño y manipulación del diacuerpo en diversas aplicaciones, proporcionando avidez potenciada por antígenos multiméricos, el entrecruzamiento de diferentes antígenos y la dirección dirigida a tipos celulares específicos dependiendo de la presencia de ambos antígenos diana. Debido a su valencia aumentada, las tasas de disociación bajas y la eliminación rápida de la circulación (para diacuerpos de pequeño tamaño, en o por debajo de ~50 kDa), las moléculas de diacuerpo conocidas en la técnica también han demostrado uso particular en el campo de las imágenes de tumores (Fitzgerald *et al.* (1997) "*Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris*", Protein Eng. 10:1221). Es de particular importancia el entrecruzamiento de diferentes células, por ejemplo, el entrecruzamiento de linfocitos T citotóxicos con células tumorales (Staerz *et al.* 1985) "*Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells*", Nature 314:628-631, y Holliger *et al.* (1996) "*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*". Protein Eng. 9:299-305). Los dominios de unión a epítipo de diacuerpo también pueden estar dirigidos a un determinante superficial de cualquier célula efectora inmunitaria tal como CD3, CD16, CD32 o CD64, que se expresan en linfocitos T, linfocitos citotóxicos naturales (NK) u otras células mononucleadas. En muchos estudios, un diacuerpo que se une a determinantes de células efectoras, por ejemplo, receptores de Fcγ (FcγR), también se descubrió que activaba la célula efectora (Holliger *et al.* (1996) "*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*", Protein Eng. 9:299-305; Holliger *et al.* (1999) "*Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins*", Cancer Res. 59:2909-2916). Normalmente, la activación de células efectoras se activa por la unión de un anticuerpo unido a antígeno a una célula efectora mediante interacción de Fc-FcγR; por tanto, a este respecto, las moléculas de diacuerpo de la divulgación pueden mostrar funcionalidad de tipo Ig independientemente de si comprenden un dominio Fc (por ejemplo, ensayo en cualquier ensayo de función efectora conocido en la técnica o ejemplificado en la presente memoria (por ejemplo, ensayo de ADCC)). Entrecruzando células tumorales y efectoras, el diacuerpo no solamente pone la célula efectora en la proximidad de las células tumorales, sino que da lugar a la eliminación eficaz del tumor (véase, por ejemplo, Cao *et al.* (2003) "*Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics*", Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197).

2.1 Receptores de células efectoras y sus funciones en el sistema inmunitario

En la función inmunitaria tradicional, la interacción de los complejos de anticuerpo-antígeno con células del sistema inmunitario produce una amplia serie de respuestas, que varían desde funciones efectoras tales como citotoxicidad dependiente de anticuerpos, desgranulación de mastocitos y fagocitosis hasta señales inmunomoduladoras tales como regulación de la proliferación de linfocitos y la secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician mediante la unión del dominio Fc de los anticuerpos o complejos inmunitarios a receptores de superficie celular especializados en células hematopoyéticas. La diversidad de las respuestas celulares activadas por los anticuerpos y los complejos inmunitarios es el resultado de la heterogeneidad estructural de los receptores de Fc. Los receptores de Fc comparten dominios de unión a antígeno estructuralmente relacionados que supuestamente median la señalización intracelular.

Los receptores de Fc γ , miembros de la superfamilia de proteínas del gen de inmunoglobulina, son glucoproteínas superficiales que pueden unirse a la parte Fc γ de moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce inmunoglobulinas de uno o más isotipos mediante un dominio de reconocimiento en la cadena α del receptor de Fc γ . Los receptores de Fc γ se definen por su especificidad por subtipos de inmunoglobulina. Los receptores de Fc γ para IgG se mencionan como Fc γ R, para IgE como Fc ϵ R y para IgA como Fc α R. Diferentes células auxiliares albergan receptores de Fc γ para anticuerpos de diferente isotipo, y el isotipo del anticuerpo determina las células auxiliares que se acoplarán en una respuesta dada (revisado por Ravetch J.V. *et al.* (1991) "*Fc Receptors*", Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92; Gerber J.S. *et al.* (2001) "*Stimulatory And Inhibitory Signals Originating From The Macrophage Fc γ Receptors*," Microbes and Infection, 3: 131-139; Billadeau D.D. *et al.* (2002), "*ITAMs Versus ITIMs: Striking A Balance During Cell Regulation*," The Journal of Clinical Investigation, 2(109): 161-1681; Ravetch J.V. *et al.* (2000) "*Immune Inhibitory Receptors*," Science, 290: 84-89; Ravetch J.V. *et al.*, (2001) "*IgG Fc Receptors*," Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. (1994) "*Fc Receptors: Rubor Redux*," Cell, 78(4): 553-60). Los diferentes receptores de Fc γ , las células que los expresan y su especificidad de isotipo se resume en la tabla 1 (adaptada de *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 4.^a edición 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York).

Receptores de Fc γ

Cada miembro de esta familia es una glucoproteína integrada en membrana que posee dominios extracelulares relacionados con un conjunto C2 de dominios relacionados con inmunoglobulina, un único dominio que abarca la membrana y un dominio intracitoplásmico de longitud variable. Hay tres Fc γ R conocidos, denominados Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32) y Fc γ RIII(CD16). Los tres receptores están codificados por distintos genes; sin embargo, la amplia homología entre los tres miembros de la familia sugiere que surgen de un progenitor común quizá por duplicación génica.

Fc γ RII(CD32)

Las proteínas Fc γ RII son glucoproteínas integradas en la membrana de 40 kDa que se unen únicamente a la IgG en complejo debido a una baja afinidad por Ig monomérica (10^6 M^{-1}). Este receptor es el Fc γ R más ampliamente expresado, presente en todas las células hematopoyéticas incluyendo los monocitos, macrófagos, linfocitos B, linfocitos NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. Fc γ RII tiene únicamente dos regiones de tipo inmunoglobulina en su cadena de unión a inmunoglobulina y, por tanto, una afinidad muy inferior por IgG que Fc γ RI. Hay tres genes de Fc γ RII humanos (Fc γ RII-A, Fc γ RII-B, Fc γ RII-C), que se unen todos a IgG en agregados o complejos inmunitarios.

Las distintas diferencias dentro de los dominios citoplásmicos de Fc γ RII-A y Fc γ RII-B crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas al ligamiento del receptor. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la señalización intracelular dando lugar a activación celular, tal como fagocitosis y explosión respiratoria, mientras que la isoforma B inicia señales inhibitoras, por ejemplo, inhibiendo la activación de linfocitos B.

Fc γ RIII(CD16)

Debido a la heterogeneidad dentro de esta clase, el tamaño de Fc γ RIII varía entre 40 y 80 kDa en ratones y seres humanos. Dos genes humanos codifican dos transcritos, Fc γ RIIIA, una glucoproteína integrada en la membrana, y Fc γ RIIIB, una versión unida a glucosilfosfatidil-inositol (GPI). Un gen murino codifica un Fc γ RIII homólogo a la Fc γ RIIIA humano que abarca la membrana. El Fc γ RIII comparte características estructurales con cada uno de los otros dos Fc γ R. Igual que Fc γ RII, Fc γ RIII se une a IgG con baja afinidad y contiene los dos correspondientes dominios de tipo Ig extracelulares. Fc γ RIIIA se expresa en macrófagos, mastocitos y es el único Fc γ R en linfocitos NK. El Fc γ RIIIB unido a GPI actualmente se sabe que se expresa únicamente en neutrófilos humanos.

Señalización mediante Fc γ R

Tanto las señales activadoras como las inhibitoras se transducen mediante los Fc γ R después del ligamiento. Estas funciones diametralmente opuestas son el resultado de diferencias estructurales entre las diferentes isoformas del receptor. Dos dominios distintos dentro de los dominios de señalización citoplásmicos del receptor llamados motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) o motivos inhibidores basados en tirosina de

inmunorreceptor (ITIM) justifican las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplásmicas a estas estructuras dictamina el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos de FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, mientras que los complejos que contienen ITIM incluyen únicamente FcγRIIB.

- 5 Los neutrófilos humanos expresan el gen de FcγRIIA. La agrupación de FcγRIIA mediante complejos inmunitarios o entrecruzamiento por anticuerpo específico sirve para agregar los ITAM junto con las cinasas asociadas a receptor que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como sitio de conexión para la Syk cinasa, cuya activación provoca la activación de sustratos posteriores (por ejemplo, PI₃K). La activación celular da lugar a la liberación de mediadores proinflamatorios.
- 10 El gen de FcγRIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es un 96% idéntico a FcγRIIA y se une a complejos de IgG de una manera indistinguible. La presencia de ITIM en el dominio citoplásmico de FcγRIIB define esta subclase inhibidora de FcγR. Recientemente se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se coliga junto con un FcγR activador, el ITIM en FcγRIIB llega a fosforilarse y atrae al dominio SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina cinasas mediada por FcγR que contiene ITAM, evitando por consiguiente el flujo entrante de Ca⁺⁺ intracelular. Por tanto, el entrecruzamiento de FcγRIIB amortigua la respuesta activadora al ligamiento de FcγR e inhibe la sensibilidad celular. La activación de linfocitos B, la proliferación de linfocitos B y la secreción de anticuerpos, por tanto, se anula.

Tabla 1. Receptores para las regiones Fc de isotipos de inmunoglobulina

Receptor	Unión	Tipo celular	Efecto de ligamiento
FcγRI (CD64)	IgG1 10^8 M^{-1}	Macrófagos	Estimulación de captación
		Neutrófilos	Activación de la explosión respiratoria
		Eosinófilos	Inducción de eliminación
		Células dendríticas	
FcγRII-A (CD32)	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	Macrófagos	Captación y liberación de gránulos
		Neutrófilos	
		Eosinófilos	
		Células dendríticas	
		Plaquetas	
FcγRII-B2 (CD32)	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	Macrófagos	Captación e inhibición de estimulación
		Neutrófilos	
		Eosinófilos	
FcγRII-B1 (CD32)	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	Linfocitos B	Sin captación
		Mastocitos	Inhibición de estimulación
FcγRIII(CD16)	IgG1	Linfocito NK	Inducción de eliminación
		Eosinófilo	
	$5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$	Macrófagos	
		Neutrófilos	
		Mastocitos	

FcεRI	IgE 10^{10} M^{-1}	Mastocitos Eosinófilo Basófilos	Secreción de gránulos
FcαRI (CD89)	IgA1, IgA2 10^7 M^{-1}	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Captación e inducción de eliminación

El documento US 2007/004909 se refiere a moléculas de diacuerpo y usos de las mismas en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos incluyendo trastornos inmunológicos y cánceres, en los que las moléculas de diacuerpo incluyen al menos dos cadenas polipeptídicas que se asocian para formar al menos dos sitios de unión a epítipo.

3. Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una molécula de diacuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 en la presente memoria. Su uso puede ser en el tratamiento de una diversidad de enfermedades y trastornos incluyendo cáncer, trastornos autoinmunitarios, trastornos de alergia y enfermedades infecciosas causadas por bacterias, hongos o virus. Preferiblemente, el diacuerpo de la presente divulgación puede unirse a dos epítipos diferentes en dos células diferentes, en el que el primer epítipo se expresa en un tipo celular diferente al segundo epítipo, de modo que el diacuerpo puede poner las dos células juntas.

Se describe un diacuerpo biespecífico covalente, que es un diacuerpo que comprende una primera y una segunda cadena polipeptídica, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítipo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo y, opcionalmente, (iii) un tercer dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyo primer y segundo dominio están unidos covalentemente de modo que el primer y segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) y, opcionalmente, (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyo cuarto y quinto dominio están unidos covalentemente de modo que el cuarto y quinto dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están unidas covalentemente, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico; en el que el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al primer epítipo; en el que el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítipo.

También se describe un diacuerpo biespecífico covalentemente, que es un diacuerpo que comprende una primera y una segunda cadena polipeptídica, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítipo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o parte del mismo, cuyo primer y segundo dominio están unidos covalentemente de modo que el primer y segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), cuyo cuarto y quinto dominio están unidos covalentemente de modo que el tercer y cuarto dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están unidas covalentemente, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico; en el que el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al primer epítipo; en el que el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítipo.

También se describe una molécula de diacuerpo, que es una molécula que comprende una primera y una segunda cadena polipeptídica, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítipo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un

domino Fc o parte de mismo, cuyo primer y segundo dominio están unidos covalentemente de modo que el primer y segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyo cuarto y quinto dominio están unidos covalentemente de modo que el cuarto y quinto dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están unidas covalentemente, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico; en el que el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al primer epítipo; en el que el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítipo.

También se describe un diacuerpo biespecífico covalentemente, que es un diacuerpo que es un dímero de moléculas de diacuerpo, comprendiendo cada molécula de diacuerpo una primera y una segunda cadena polipeptídica, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítipo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo y, (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o parte de mismo, cuyo primer y segundo dominio están unidos covalentemente de modo que el primer y segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyo cuarto y quinto dominio están unidos covalentemente de modo que el cuarto y quinto dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica de cada molécula de diacuerpo están unidas covalentemente, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico; en el que el primer dominio y el quinto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al primer epítipo; en el que el segundo dominio y el cuarto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítipo.

Como alternativa se describe un diacuerpo tetraespecífico covalentemente, que es un diacuerpo que es un dímero de moléculas de diacuerpo, comprendiendo la primera molécula de diacuerpo una primera y una segunda cadena polipeptídica, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítipo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo y, (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o parte de mismo, cuyo primer y segundo dominio están unidos covalentemente de modo que el primer y segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyo cuarto y quinto dominio están unidos covalentemente de modo que el cuarto y quinto dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están unidas covalentemente, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico; en el que el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al primer epítipo; en el que el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítipo; y comprendiendo la segunda molécula de diacuerpo una primera y una segunda cadena polipeptídica, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una tercera inmunoglobulina (VL3) específica para un tercer epítipo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una cuarta inmunoglobulina (VH4) específica para un cuarto epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o parte del mismo, cuyo primer y segundo dominio están unidos covalentemente de modo que el primer y segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la cuarta inmunoglobulina (VL4), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la tercera inmunoglobulina (VH3) y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyo cuarto y quinto dominio están unidos covalentemente de modo que el cuarto y quinto dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están unidas covalentemente, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico; en el que el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL3)(VH3) que se une al tercer epítipo; en el que el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL4)(VH4) que se une al cuarto epítipo.

En determinados aspectos de la molécula de diacuerpo, el primer epítipo, el segundo epítipo y, cuando sea aplicable, el tercer epítipo y el cuarto epítipo pueden ser iguales. En otros aspectos, el primer epítipo, el segundo epítipo y, cuando sea aplicable, el tercer epítipo y el cuarto epítipo pueden ser diferentes entre sí. En determinados aspectos de la molécula de diacuerpo que comprende un tercer dominio de unión a epítipo, el primer epítipo y el tercer epítipo pueden ser iguales. En determinados aspectos de la molécula de diacuerpo que comprende un cuarto dominio de unión a epítipo, el primer epítipo y el cuarto epítipo pueden ser iguales. En determinados aspectos de la molécula de diacuerpo que comprende un tercer dominio de unión a epítipo, el segundo epítipo y el tercer epítipo pueden ser iguales. En determinados aspectos de la molécula de diacuerpo que comprende un cuarto dominio de unión a epítipo, el segundo epítipo y el cuarto epítipo pueden ser iguales. En aspectos preferidos de la molécula de diacuerpo, el primer epítipo y el segundo epítipo son diferentes. En otros aspectos más de la molécula de diacuerpo que comprende un tercer dominio de unión a epítipo y un cuarto dominio de unión a epítipo, el tercer epítipo y el cuarto epítipo pueden ser diferentes. Debe entenderse que cualquier combinación de los anteriores está abarcada en la presente divulgación.

En aspectos particulares de la divulgación, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o molécula de diacuerpo pueden obtenerse de la misma inmunoglobulina. En otro aspecto, el segundo dominio y el cuarto dominio del diacuerpo o molécula de diacuerpo pueden obtenerse de la misma inmunoglobulina. En otro aspecto más, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o molécula de diacuerpo pueden obtenerse de una inmunoglobulina diferente. En otro aspecto más, el segundo dominio y el cuarto dominio del diacuerpo o molécula de diacuerpo pueden obtenerse de una inmunoglobulina diferente. Debe entenderse que cualquier combinación de los anteriores está abarcada en la presente divulgación.

En determinados aspectos de la divulgación, la unión covalente entre la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica del diacuerpo o molécula de diacuerpo puede ser mediante un enlace disulfuro entre al menos un resto de cisteína en la primera cadena polipeptídica y al menos un resto de cisteína en la segunda cadena polipeptídica. Los restos de cisteína en la primera y segunda cadena polipeptídica que son responsables de la unión por disulfuro pueden encontrarse en cualquier parte en la cadena polipeptídica incluyendo dentro del primer, segundo, tercer, cuarto, quinto y sexto dominio. En una realización específica, el resto de cisteína en la primera cadena polipeptídica se encuentra en el primer dominio y el resto de cisteína en la segunda cadena polipeptídica se encuentra en el quinto dominio. El primer, segundo, cuarto y quinto dominio corresponden a las regiones variables responsables de la unión. En realizaciones preferidas, los restos de cisteína responsables de la unión por disulfuro entre la primera y segunda cadena polipeptídica están ubicados dentro del tercer y sexto dominio, respectivamente. En un aspecto particular de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos del extremo C de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23) que pueden estar codificados por la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17). En otro aspecto de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos del extremo C de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23) que pueden estar codificados por la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17). En otro aspecto más de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77), obtenida del dominio de bisagra de una IgG humana, y que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 78). En otro aspecto de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77), obtenida del dominio de bisagra de una IgG humana, y que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 78). En determinados aspectos de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos del extremo C de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23); y el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77). En otros aspectos de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos del extremo C de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77). En otros aspectos más de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos del extremo C de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23); y el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende un dominio de bisagra. En otros aspectos de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos del extremo C de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende el dominio de bisagra. En otros aspectos más de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos del extremo C de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23); y el sexto dominio de la primera cadena polipeptídica comprende un dominio Fc o parte del mismo. En otros aspectos más de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos del extremo C de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende el dominio Fc o parte del mismo.

En otras realizaciones, los restos de cisteína en el primer o segundo polipéptido que son responsables de la unión por disulfuro pueden estar ubicados fuera del primer, segundo o tercer dominio en la primera cadena polipeptídica y fuera del cuarto, quinto y sexto dominio en la segunda cadena polipeptídica. En particular, el resto de cisteína en la primera cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del primer dominio o puede estar en el extremo C del primer dominio. El resto de cisteína en la primera cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del segundo

dominio o puede estar en el extremo C del segundo dominio. El resto de cisteína en la primera cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del tercer dominio o puede estar en el extremo C del tercer dominio. Además, el resto de cisteína en la segunda cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del cuarto dominio o puede estar en el extremo C del cuarto dominio. El resto de cisteína en la segunda cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del quinto dominio o puede estar en el extremo C del quinto dominio. Por consiguiente, el resto de cisteína en la segunda cadena polipeptídica puede estar en el extremo C del sexto dominio o puede estar en el extremo N del sexto dominio. En un aspecto particular, el enlace disulfuro puede estar entre al menos dos restos de cisteína en la primera cadena polipeptídica y al menos dos restos de cisteína en la segunda cadena polipeptídica. En un aspecto particular, en el que el tercer dominio y el sexto dominio no comprenden un dominio Fc o parte del mismo, el resto de cisteína puede estar en el extremo C de la primera cadena polipeptídica y en el extremo C de la segunda cadena polipeptídica. Debe entenderse que cualquier combinación de los anteriores está abarcada en la presente divulgación.

En realizaciones específicas de la molécula de diacuerpo descrita *supra*, el diacuerpo covalente de la divulgación abarca dímeros de moléculas de diacuerpo, en los que cada molécula de diacuerpo comprende una primera y segunda cadena polipeptídica. En determinados aspectos de esta realización, las moléculas de diacuerpo pueden estar unidas covalentemente para formar el dímero, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico. En aspectos preferidos de esta realización, la unión covalente es un enlace disulfuro entre al menos un resto de cisteína en la primera cadena polipeptídica de cada una de las moléculas de diacuerpo del dímero. En aspectos aún más preferidos de esta divulgación, la unión covalente es un enlace disulfuro entre al menos un resto de cisteína en la primera cadena polipeptídica de cada una de las moléculas de diacuerpo que forman el dímero, en las que dicho al menos un resto de cisteína está ubicado en el tercer dominio de cada primera cadena polipeptídica.

En determinados aspectos de la divulgación, el primer dominio en la primera cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del segundo dominio o puede estar en el extremo C del segundo dominio. El primer dominio en la primera cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del tercer dominio o puede estar en el extremo C del tercer dominio. El segundo dominio en la primera cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del primer dominio o puede estar en el extremo C del primer dominio. Además, el segundo dominio en la primera cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del tercer dominio o puede estar en el extremo C del tercer dominio. Por consiguiente, el tercer dominio en la primera cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del primer dominio o puede estar en el extremo C del primer dominio. El tercer dominio en la primera cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del segundo dominio o puede estar en el extremo C del segundo dominio. Con respecto a la segunda cadena polipeptídica, el cuarto dominio puede estar en el extremo N del quinto dominio o puede estar en el extremo C del quinto dominio. El cuarto dominio puede estar en el extremo N del sexto dominio o puede estar en el extremo C del sexto dominio. El quinto dominio en la segunda cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del cuarto dominio o puede estar en el extremo C del cuarto dominio. El quinto dominio en la segunda cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del sexto dominio o puede estar en el extremo C del sexto dominio. Por consiguiente, el sexto dominio en la segunda cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del cuarto dominio o puede estar en el extremo C del cuarto dominio. El sexto dominio en la segunda cadena polipeptídica puede estar en el extremo N del quinto dominio o puede estar en el extremo C del quinto dominio. Debe entenderse que cualquier combinación de los anteriores está abarcada en la presente divulgación.

En determinadas realizaciones, el primer dominio y el segundo dominio pueden estar ubicados en el extremo C del tercer dominio en la primera cadena polipeptídica; o el primer dominio y el segundo dominio pueden estar ubicados en el extremo N del tercer dominio en la primera cadena polipeptídica. Con respecto a la segunda cadena polipeptídica, el cuarto dominio y el quinto dominio pueden estar ubicados en el extremo C del sexto dominio o el cuarto dominio y el quinto dominio pueden estar ubicados en el extremo N del sexto dominio. En determinados aspectos de esta realización, la presente divulgación se refiere a un diacuerpo biespecífico covalentemente, que es un diacuerpo que es un dímero de moléculas de diacuerpo, comprendiendo cada molécula de diacuerpo una primera y una segunda cadena polipeptídica, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítipo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o parte de mismo, cuyo primer y segundo dominio están unidos covalentemente de modo que el primer y segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo y en el que el tercer dominio está ubicado en el extremo N tanto del primero como del segundo dominio; y cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyo cuarto y quinto dominio están unidos covalentemente de modo que el cuarto y quinto dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica de cada molécula de diacuerpo están unidas covalentemente, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico; en el que el primer dominio y el quinto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al primer

epítipo; en el que el segundo dominio y el cuarto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítipo.

También se describe un diacuerpo tetraespecífico covalentemente, que es un diacuerpo que es un dímero de moléculas de diacuerpo, comprendiendo la primera molécula de diacuerpo una primera y una segunda cadena polipeptídica, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítipo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o parte de mismo, cuyo primer y segundo dominio están unidos covalentemente de modo que el primer y segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo y en el que el tercer dominio está ubicado en el extremo N tanto del primer dominio como del segundo dominio; y cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyo cuarto y quinto dominio están unidos covalentemente de modo que el cuarto y quinto dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están unidas covalentemente, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico; en el que el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al primer epítipo; en el que el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítipo; y la segunda molécula de diacuerpo comprende una primera y una segunda cadena polipeptídica, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una tercera inmunoglobulina (VL3) específica para un tercer epítipo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una cuarta inmunoglobulina (VH4) específica para un cuarto epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o parte del mismo, cuyo primer y segundo dominio están unidos covalentemente de modo que el primer y segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo y en el que el tercer dominio está ubicado en el extremo N tanto del primer dominio como del segundo dominio; y cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la cuarta inmunoglobulina (VL4), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la tercera inmunoglobulina (VH3) y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyo cuarto y quinto dominio están unidos covalentemente de modo que el cuarto y quinto dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están unidas covalentemente, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico; en el que el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL3)(VH3) que se une al tercer epítipo; en el que el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de (VL4)(VH4) que se une al cuarto epítipo.

Como se analiza anteriormente, los dominios en las cadenas polipeptídicas individuales están unidos covalentemente. En aspectos específicos, la unión covalente entre el primer y segundo dominio, el primer y tercer dominio, el segundo y tercer dominio, el cuarto y quinto dominio, el cuarto y sexto dominio, y/o el quinto y sexto dominio puede ser un enlace peptídico. En particular, el primer y segundo dominio, y el cuarto y quinto dominio pueden estar separados por el tercer dominio y el sexto dominio, respectivamente, o por restos de aminoácido adicionales, siempre que el primer y segundo, y cuarto y quinto dominios no se asocien para formar un sitio de unión. El número de restos de aminoácido puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos de aminoácido. En un aspecto preferido, el número de restos de aminoácido entre los dominios es 8.

En determinados aspectos de la molécula de diacuerpo, los dominios de la primera y segunda cadena polipeptídica que comprenden un dominio Fc, es decir, opcionalmente, el tercer y sexto dominio, respectivamente, pueden comprender además un dominio de bisagra de modo que el dominio comprenda una región de bisagra-Fc. En realizaciones alternativas, la primera cadena polipeptídica o la segunda cadena polipeptídica pueden comprender un dominio de bisagra sin que comprenda también un dominio Fc. Las cadenas pesadas, cadenas ligeras, regiones de bisagra, dominios Fc y/o dominios de bisagra-Fc para su uso en la molécula de diacuerpo pueden obtenerse de cualquier tipo de inmunoglobulina incluyendo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En un aspecto preferido, el tipo de inmunoglobulina es IgG, o cualquier subtipo de la misma, es decir, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄. En otros aspectos, la inmunoglobulina de la que se obtienen las cadenas pesadas y ligeras está humanizada o quimerizada.

Además, el primer epítipo y el segundo epítipo y, cuando sea aplicable el tercer epítipo y el cuarto epítipo, al que se une el diacuerpo o molécula de diacuerpo pueden ser epítipos diferentes del mismo antígeno o pueden epítipos diferentes de antígenos diferentes. Los antígenos pueden ser cualquier molécula contra la que pueda generarse un anticuerpo. Por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, toxinas bacterianas, marcadores de superficie celular, marcadores autoinmunitarios, proteínas víricas, fármacos, etc. En aspectos particulares, al menos un sitio de unión a epítipo del diacuerpo es específico para un antígeno en una célula particular, tal como un linfocito B, un linfocito T, una célula fagocítica, un linfocito citolítico natural (NK) o una célula dendrítica.

En determinados aspectos de la presente invención, al menos un sitio de unión a epítipo del diacuerpo o molécula de diacuerpo es específico para un receptor de Fc, que es un receptor de Fc que puede ser un receptor de Fc activador o un receptor de Fc inhibidor. En aspectos particulares, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ , y el receptor de Fc γ es un receptor Fc γ RI, Fc γ RII o Fc γ RIII. En aspectos más preferidos, el receptor Fc γ RIII es el receptor Fc γ RIIIA (CD16A) o el receptor Fc γ RIIIB (CD16B) y, más preferiblemente, el receptor Fc γ RIII es el receptor Fc γ RIIIA (CD16A). En otro aspecto preferido, el receptor Fc γ RII es el receptor Fc γ RIIA (CD32A) o el receptor Fc γ RIIB (CD32B) y, más preferiblemente, el receptor Fc γ RIIB (CD32B). En un aspecto particularmente preferido, un sitio de unión del diacuerpo es específico para CD32B y el otro sitio de unión es específico para CD16A. En una realización específica de la molécula de diacuerpo, al menos un sitio de unión a epítipo del diacuerpo o molécula de diacuerpo es específico para un receptor de Fc activador y al menos el otro sitio es específico para un receptor de Fc inhibidor. En determinados aspectos de esta realización, el receptor de Fc activador es CD32A y el receptor de Fc inhibidor es CD32B. En otros aspectos de esta realización, el receptor de Fc activador es BCR y el receptor de Fc inhibidor es CD32B. En otros aspectos más de esta realización, el receptor de Fc activador es IgERI y el receptor de Fc inhibidor es CD32B.

En casos donde un sitio de unión a epítipo es específico para CD16A, los dominios VL y VH pueden ser iguales a o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo de ratón 3G8, cuya secuencia se ha clonado y se expone en la presente memoria. En otros casos donde un sitio de unión a epítipo es específico para CD32A, los dominios VL y VH pueden ser iguales a o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo de ratón IV.3. En otros casos más donde un sitio de unión a epítipo es específico para CD32B, los dominios VL y VH pueden ser iguales a o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo de ratón 2B6, cuya secuencia se ha clonado y se expone en la presente memoria. Debe entenderse que cualquiera de los dominios VL o VH de los anticuerpos 3G8, 2B6 e IV.3 puede usarse en cualquier combinación. También se describe un diacuerpo o molécula de diacuerpo biespecífico en el que el primer epítipo es específico para CD32B y el segundo epítipo es específico para CD16A.

En otros aspectos, un sitio de unión a epítipo puede ser específico para un antígeno patógeno. Tal como se usa en la presente memoria, un antígeno patógeno es un antígeno implicado en una enfermedad patógena específica, incluyendo cáncer, infección y enfermedad autoinmunitaria. Por tanto, el antígeno patógeno puede ser un antígeno tumoral, un antígeno bacteriano, un antígeno vírico o un antígeno autoinmunitario. Los antígenos patógenos ejemplares incluyen, aunque sin limitación, lipopolisacárido, antígenos víricos seleccionados del grupo que consiste en antígenos víricos del virus de la inmunodeficiencia humana, adenovirus, virus sincitial respiratorio, virus del Nilo occidental (por ejemplo, antígenos E16 y/o E53) y virus de la hepatitis, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y colágeno. Preferiblemente, el antígeno patógeno es un antígeno neutralizante. En un aspecto preferido, cuando un sitio de unión a epítipo es específico para CD16A o CD32A, el otro sitio de unión a epítipo es específico para un antígeno patógeno excluyendo antígenos autoinmunitarios. En un aspecto preferido más, cuando un sitio de unión a epítipo es específico para CD32B, el otro sitio de unión a epítipo es específico para cualquier antígeno patógeno. En realizaciones específicas, la molécula de diacuerpo de la divulgación se une a dos antígenos diferentes en la misma célula, por ejemplo, un sitio de unión a antígeno es específico para un receptor de Fc activador mientras que otro es específico para un receptor de Fc inhibidor. En otras realizaciones, la molécula de diacuerpo se une a dos epítopos neutralizantes víricos distintos, por ejemplo, aunque sin limitación, E16 y E53 del virus del Nilo occidental.

Los diacuerpos de la divulgación pueden usarse para tratar una diversidad de enfermedades y trastornos. Se describe un método para tratar una enfermedad o trastorno, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un diacuerpo o molécula de diacuerpo covalente de la divulgación en que al menos un sitio de unión es específico para un antígeno patógeno, tal como un antígeno expresado en la superficie de una célula cancerosa o en la superficie de una bacteria o virión y al menos el otro sitio de unión es específico para un receptor de Fc, por ejemplo, CD16A.

También se describe un método para tratar una enfermedad o trastorno, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un diacuerpo o molécula de diacuerpo de la divulgación, en que al menos un sitio de unión es específico para CD32B y al menos el otro sitio de unión es específico para CD16A.

También se describe un método para inducir tolerancia inmunitaria a antígeno patógeno, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un diacuerpo covalente o molécula de diacuerpo covalente de la divulgación, en que al menos un sitio de unión es específico para CD32B y al menos el otro sitio de unión es específico para dicho antígeno patógeno. En aspectos de esta realización, el antígeno patógeno puede ser un alérgeno u otra molécula para la que se desea tolerancia inmunitaria, tal como una proteína expresada en tejido trasplantado.

También se describe un método para la desintoxicación, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un diacuerpo o molécula de diacuerpo covalente de la divulgación, en que al menos un sitio de unión es específico para un marcador de superficie celular y al menos el otro sitio de unión es específico para una toxina. El diacuerpo de la divulgación administrado puede ser uno donde un sitio de unión es específico para un marcador de superficie celular tal como un Fc y el otro sitio de unión es específico para una toxina bacteriana o para un fármaco. El marcador de superficie celular puede no encontrarse en glóbulos rojos.

3.1 Definiciones

Salvo que se definan de otro modo, se pretende que todos los términos de la técnica, anotaciones y otros términos científicos o terminología usados en la presente memoria tengan los significados habitualmente comprendidos por los expertos en la materia a la que pertenece esta divulgación. En algunos casos, términos con significados habitualmente comprendidos se definen en la presente memoria por motivos de claridad y/o facilitar referencias, y la inclusión de dichas definiciones en la presente memoria no debe interpretarse necesariamente que represente una diferencia sustancial sobre lo que se entiende generalmente en la técnica. La práctica de la presente divulgación empleará, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que pertenecen a las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan *et al.*, ed., 1999, incluyendo los suplementos hasta 2001); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel *et al.*, ed., 1987, incluyendo los suplementos hasta 2001); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, ed., 1994); The Immunoassay Handbook (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); Bioconjugate Techniques (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); Methods of Immunological Analysis (R. Masseyeff, W. H. Albert, y N. A. Staines, ed., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow y Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999; y Beaucage *et al.* ed., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2000).

Tal como se en la presente memoria, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv biespecíficos unidos por disulfuro (sdFv), intracuerpos y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id contra anticuerpos de la divulgación), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "se une inmunoespecíficamente", "reconoce inmunoespecíficamente", "se une específicamente", "reconoce específicamente" y expresiones análogas se refieren a moléculas se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, epítipo o complejo inmunitario) y no se unen específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad, determinada por, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcore y otros ensayos conocidos en la técnica. Preferiblemente, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no reaccionan de forma cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un antígeno pueden identificarse, por ejemplo, por inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas para los expertos en la materia.

Tal como se usa en la presente memoria, "complejo inmunitario" se refiere a una estructura que se forma cuando al menos una molécula diana y al menos un polipéptido que contiene región Fc γ heteróloga se unen entre sí formando un complejo de mayor peso molecular. Ejemplos de complejos inmunitarios son complejos de antígeno-anticuerpo que pueden ser soluble o en forma de partícula (por ejemplo, un complejo de antígeno/anticuerpo en una superficie celular).

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "cadena pesada", "cadena ligera", "región variable", "región estructural", "dominio constante" y similares tienen su significado habitual en la técnica de inmunología y se refieren a dominios en inmunoglobulinas de origen natural y los dominios correspondientes de proteínas de unión sintéticas (por ejemplo, recombinantes) (por ejemplo, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos, etc.). La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas de origen natural (por ejemplo, IgG) es un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, habitualmente expresadas como una glucoproteína de aproximadamente 150 000 Da. La parte del extremo amino ("N") de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La parte del extremo carboxi ("C") de cada cadena define una región constante, con cadenas ligeras que tienen un único dominio constante y cadenas pesadas que habitualmente tienen tres dominios constantes y una región de bisagra. Por tanto, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula de IgG es n-V_L-C_L-c y la estructura de las cadenas pesadas de IgG es n-V_H-C_{H1}-H-C_{H2}-C_{H3}-c (donde H es la región de bisagra). Las regiones variables de una molécula de IgG consisten en las regiones determinantes de complementariedad (CDR), que contienen los restos en contacto con el antígeno y segmentos que no son CDR, mencionados como segmentos estructurales, que en general mantienen la estructura y determinan la ubicación de los bucles CDR (aunque determinados restos estructurales también pueden entrar en contacto con el antígeno). Por tanto, los dominios V_L y V_H tienen la estructura n-FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4-c.

Cuando se hace referencia a proteínas de unión o anticuerpos (que se definen ampliamente en la presente memoria), la asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991). Los aminoácidos de

las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras maduras de las inmunoglobulinas se denominan por la posición de un aminoácido en la cadena. Kabat describió numerosas secuencias de aminoácidos para anticuerpos, identificó una secuencia de consenso de aminoácidos para cada subgrupo y asignó un número de resto a cada aminoácido. El esquema de numeración de Kabat es ampliable a anticuerpos no incluidos en su compendio mediante alineación del anticuerpo en cuestión con una de las secuencias de consenso de Kabat por referencia a los aminoácidos conservados. Este método para asignar números de resto se ha convertido en la norma en el campo e identifica fácilmente los aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos, incluyendo variantes quiméricas o humanizadas. Por ejemplo, un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo de ratón.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "cadena pesada" se usa para definir la cadena pesada de un anticuerpo IgG. En una IgG nativa intacta, la cadena pesada comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1 bisagra, CH2 y CH3. En toda la presente memoria descriptiva, la numeración de los restos en una cadena pesada de IgG es la del índice EU como en Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración del anticuerpo humano IgG1 EU. Se muestran ejemplos de las secuencias de aminoácidos que contienen los dominios de bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 humana en las figuras 1A y 1B como se describe, *infra*. Las figuras 1A y 1B también exponen secuencias de aminoácidos de los dominios de bisagra CH2 y CH3 de las cadenas pesadas de IgG2, IgG3 e IgG4. Las secuencias de aminoácidos de los isotipos IgG2, IgG3 e IgG4 se alinean con las secuencias de IgG1 colocando el primer y último resto de cisteína de las regiones de bisagra respectivas, que forman los enlaces S-S entre las cadenas pesadas, en las mismas posiciones. Para la región de bisagra de IgG2 e IgG3, no todos los restos están numerados por el índice EU.

La "región de bisagra" o "dominio de bisagra" en general se define abarcando desde Glu216 hasta Pro230 de IgG1 humana. Se muestra un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la región de bisagra de IgG1 humana en la figura 1A (los restos de aminoácido en la figura 1A están enumerados de acuerdo con el sistema de Kabat. Las regiones de bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando el primer y el último resto de cisteína que forman los enlaces S-S entre las cadenas pesadas en las mismas posiciones como se muestra en la figura 1A.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "región Fc", "dominio Fc" o expresiones análogas se usan para definir una región en el extremo C de una cadena pesada de IgG. Se muestra un ejemplo de la secuencia de aminoácidos que contiene la IgG1 humana en la figura 1B. Aunque los límites pueden variar ligeramente, según se enumera de acuerdo con el sistema de Kabat, el dominio Fc se prolonga desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 447 (los restos de aminoácidos en la figura 1B están numerados de acuerdo con el sistema de Kabat). La figura 1B también proporciona ejemplos de las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc de los isotipos de IgG IgG2, IgG3, e IgG4.

La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana habitualmente se prolonga desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 341 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (figura 1B). El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana habitualmente se prolonga desde el aminoácido 342 hasta el 447 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (figura 1B). El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana (también mencionada como dominio "Cy2" es único porque no se empareja mucho con otro dominio. En su lugar, dos cadenas glucídicas ramificadas unidas a N están interpuestas entre los dos dominios CH2 de una IgG nativa intacta.

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "proteína de unión a FcγR", "anticuerpo contra FcγR" y "anticuerpo anti-FcγR", se usan indistintamente y se refieren a una diversidad de proteínas de tipo inmunoglobulina o derivadas de inmunoglobulina. Las "proteínas de unión a FcγR" se unen a FcγR mediante una interacción con los dominios VL y/o VH (que son distintos de la unión mediada a Fcγ). Los ejemplos de proteínas de unión a FcγR incluyen anticuerpos completamente humanos, policlonales, quiméricos y humanizados (por ejemplo, que comprenden 2 cadenas pesadas y 2 ligeras), fragmentos de los mismos (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), anticuerpos bifuncionales o multifuncionales (véase, por ejemplo, Lanzavecchia *et al.* (1987) "The Use Of Hybrid Hybridomas To Target Human Cytotoxic T Lymphocytes", Eur. J. Immunol. 17:105-111), anticuerpos monocatenarios (véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-26), proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión de presentación en fagos), "minicuerpos" (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5837821) y otras proteínas de unión a antígeno que comprenden un dominio VL y/o VH o fragmento del mismo. En un aspecto, la proteína de unión a FcγRIIIA es un "anticuerpo tetramérico", es decir, que tiene en general la estructura de una IgG de origen natural y que comprende dominios variables y constantes, es decir, dos cadenas ligeras que comprenden un dominio VL y un dominio constante de cadena ligera y dos cadenas pesadas que comprenden un dominio VH y un dominio de bisagra y dominios constantes de cadena pesada.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "antagonistas de FcγR" y expresiones análogas se refieren a sustancias proteínicas y no proteínicas, incluyendo moléculas pequeñas que antagonizan al menos una actividad

biológica de un FcγR, por ejemplo, bloquean la señalización. Por ejemplo, las moléculas de la divulgación bloquean la señalización bloqueando la unión de las IgG a un FcγR.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "derivado", en el contexto de polipéptidos o proteínas, se refiere a un polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha alterado mediante la introducción de sustituciones, eliminaciones o adiciones de restos de aminoácido. El término "derivado", tal como se usa en la presente memoria, también se refiere a un polipéptido o proteína que se ha modificado, es decir, mediante adhesión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o proteína. Por ejemplo, aunque no a modo de limitación, un anticuerpo puede modificarse, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un antígeno celular u otra proteína, etc. Un polipéptido o proteína derivada puede producirse por modificaciones químicas usando técnicas conocidas para los expertos en la materia incluyen, aunque sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un polipéptido derivado a derivado de proteína posee una función similar o idéntica al polipéptido o proteína de la que se obtuvo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "derivado", en el contexto de un derivado no proteínico, se refiere a una segunda molécula orgánica o inorgánica que se forma basándose en la estructura de una primera molécula orgánica o inorgánica. Un derivado de una molécula orgánica incluye, aunque sin limitación, una molécula modificada, por ejemplo, por la adición o eliminación de un grupo hidroxilo, metilo, etilo, carboxilo o amina. Una molécula orgánica también puede esterificarse, alquilarse y/o fosforilarse.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "molécula de diacuerpo" se refiere a un complejo de dos o más cadenas polipeptídicas o proteínas, comprendiendo cada una al menos un dominio VL y uno VH o fragmento del mismo, en el que ambos dominios están comprendidos dentro de una única cadena polipeptídica. En determinadas realizaciones, la "molécula de diacuerpo" incluye moléculas que comprenden un dominio Fc o de bisagra-Fc. Dichas cadenas polipeptídicas en el complejo pueden ser iguales o diferentes, es decir, la molécula de diacuerpo puede ser un homomultímero o un heteromultímero. En aspectos específicos, la "molécula de diacuerpo" incluye dímeros o tetrámeros o dichas cadenas polipeptídicas que contienen tanto un dominio VL como VH. Las cadenas polipeptídicas individuales que comprenden las proteínas multiméricas pueden unirse covalentemente a al menos otro péptido del multímero mediante enlaces disulfuro intercatenarios.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan indistintamente para hacer referencia a una afección en su sujeto. En particular, la expresión "enfermedad autoinmunitaria" se usa indistintamente con la expresión "trastorno autoinmunitario", para hacer referencia a una afección en un sujeto, caracterizada por lesión celular, tisular y/u orgánica causada por una reacción inmunológica del sujeto contra sus propias células, tejidos y/u órganos. La expresión "enfermedad inflamatoria" se usa indistintamente con la expresión "trastorno inflamatorio" para hacer referencia a una afección en un sujeto, caracterizada por inflamación, preferiblemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden estar asociados o no a inflamación. Además, la inflamación puede estar causada o no por un trastorno autoinmunitario. Por tanto, determinados trastornos pueden caracterizarse como trastornos tanto autoinmunitarios como inflamatorios.

"Cadenas polipeptídicas idénticas", tal como se usa en la presente memoria, también se refiere a cadenas polipeptídicas que tienen una secuencia de aminoácidos casi idéntica, por ejemplo, que incluye cadenas que tienen una o más diferencias de aminoácido, preferiblemente sustituciones conservativas de aminoácido, de modo que la actividad de las dos cadenas polipeptídicas no sea significativamente diferente.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "cáncer" se refiere a una neoplasia o tumor como resultado de un crecimiento incontrolado anómalo de células. Tal como se usa en la presente memoria, el cáncer incluye explícitamente leucemias y linfomas. En algunas realizaciones, el cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otras realizaciones, el cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales adyacentes y se ha propagado a sitios distantes. En algunas realizaciones, el cáncer está asociado a un antígeno canceroso específico.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "agentes inmunomodulador" y variaciones de la misma se refieren a un agente que modula el sistema inmunitario de un hospedador. En determinadas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En otras determinadas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunomoduladores incluyen, aunque sin limitación, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos y moléculas orgánicas.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "epítipo" se refiere a un fragmento de un polipéptido o proteína o una molécula no proteínica que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferiblemente en un mamífero, y muy preferiblemente en un ser humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o proteína que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o proteína al que se une un anticuerpo inmuno-específicamente como

se determina por cualquier método bien conocido para los expertos en la materia, por ejemplo, por inmunoensayos. Los epítopos antigénicos no tienen que ser necesariamente inmunogénicos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "fragmento" se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos de aminoácido contiguos, al menos 10 restos de aminoácido contiguos, al menos 15 restos de aminoácido contiguos, al menos 20 restos de aminoácido contiguos, al menos 25 restos de aminoácido contiguos, al menos 40 restos de aminoácido contiguos, al menos 50 restos de aminoácido contiguos, al menos 60 restos de aminoácido contiguos, al menos 70 restos de aminoácido contiguos, al menos 80 restos de aminoácido contiguos, al menos 90 restos de aminoácido contiguos, al menos 100 restos de aminoácido contiguos, al menos 125 restos de aminoácido contiguos, al menos 150 restos de aminoácido contiguos, al menos 175 restos de aminoácido contiguos, al menos 200 restos de aminoácido contiguos, o al menos 250 restos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido retiene al menos una función del polipéptido.

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "ácidos nucleicos" y "secuencias de nucleótidos" incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas de ADN/ARN híbridas, y análogos de moléculas de ADN o ARN. Dichos análogos pueden generarse usando, por ejemplo, análogos nucleotídicos que incluyen, aunque sin limitación, bases de inosina o tritiladas. Dichos análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden estructuras modificadas que confieren atributos beneficiosos a las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasa o una capacidad aumentada de cruzar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser monocatenarias, bicatenarias, pueden contener tanto partes monocatenarias como bicatenarias y pueden contener partes tricatenarias, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

Tal como se usa en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a esa cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o controlar una enfermedad o trastorno. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retardar o minimizar la aparición de enfermedad, por ejemplo, retardar o minimizar la diseminación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o control de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la divulgación significa la cantidad de agente terapéutico en solitario, o en combinación con otros tratamientos, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o control de una enfermedad.

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier agente o agentes que puedan usarse en la prevención de un trastorno, o prevención de recidiva o diseminación de un trastorno. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente profiláctico suficiente para prevenir la recidiva o diseminación de enfermedad hiperproliferativa, particularmente cáncer, o la aparición de ésta en un paciente, incluyendo, aunque sin limitación, los predispuestos a enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo, los genéticamente predispuestos a cáncer o expuestos previamente a carcinógenos. Una cantidad profilácticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad. Además, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a un agente profiláctico de la divulgación significa esa cantidad de agente profiláctico en solitario, o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" se refieren a la prevención de la recidiva o aparición de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto como resultado de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "en combinación" se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico. El uso de la expresión "en combinación" no restringe el orden en que se administran los agentes profilácticos y/o terapéuticos a un sujeto con un trastorno. Un primer agente profiláctico o terapéutico puede administrarse antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semanas, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), simultáneamente con, o después de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto con un trastorno.

"Función efectora", tal como se usa en la presente memoria, indica un evento bioquímico que es el resultado de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor de Fc a un antígeno. Las funciones efectoras incluyen, aunque sin limitación, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las funciones efectoras incluyen tanto aquella que funcionan después de la unión de un antígeno como aquellas que funcionan independientemente de la unión a antígeno.

"Célula efectora", tal como se usa en la presente memoria, indica una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores de Fc y media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, aunque sin limitación, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, linfocitos B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, linfocitos citolíticos naturales (NK) y pueden ser de cualquier organismo incluyendo, aunque sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "se une específicamente a un complejo inmunitario" y expresiones análogas se refieren a moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario y no se unen específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un complejo inmunitario puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad determinada por, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcore y otros ensayos conocidos en la técnica. Preferiblemente, las moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario no reaccionan de forma cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario pueden identificarse, por ejemplo, por inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas para los expertos en la materia.

Una "proteína de fusión estable", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una proteína de fusión que experimenta un nivel mínimo a no detectable de degradación durante la producción y/o almacenamiento, evaluado usando ensayos bioquímicos y funcionales comunes conocidos para un experto en la materia, y pueden almacenarse durante un periodo prolongado de tiempo sin pérdida en la actividad biológica, por ejemplo, unión a FcγR.

4. Breve descripción de los dibujos

FIG. 1 A-B Secuencia de aminoácidos de las regiones CHI, de bisagra y Fc de IgG humana

La figura 1 proporciona las secuencias de aminoácidos de los dominios de bisagra (A) y Fc (B) de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas. (Dominio de bisagra de IgG1 (SEQ ID NO: 1); dominio de bisagra de IgG2 (SEQ ID NO: 2); dominio de bisagra de IgG3 (SEQ ID NO: 3); dominio de bisagra de IgG4 (SEQ ID NO: 4); dominio Fc de IgG1 (SEQ ID NO: 5); dominio Fc de IgG2 (SEQ ID NO: 6); dominio Fc de IgG3 (SEQ ID NO: 7); dominio Fc de IgG1 (SEQ ID NO: 8)). Los restos de aminoácido mostrados en las figuras 1A y 1B están numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat EU. Las secuencias de isotipo se alinean con las secuencias de IgG1 colocando el primer y último resto de cisteína de las regiones de bisagra respectivas, que forman los enlaces S-S entre las cadenas pesadas, en las mismas posiciones. Para la figura 1B, los restos en el dominio CH2 se indican por +, mientras que los restos en el dominio CH3 se indican por ~.

FIG. 2 Representación esquemática de cadenas polipeptídicas de diacuerpos bifuncionales covalentes

Los polipéptidos de un diacuerpo bifuncional covalente consisten en un dominio VL de anticuerpo y un dominio VH de anticuerpo separados por un corto conector peptídico. El conector de 8 restos de aminoácido evita el autoensamblaje de una única cadena polipeptídica en construcciones scFv y, en su lugar, predominan las interacciones entre los dominios VL y VH de diferentes cadenas polipeptídicas. Se crearon 4 construcciones (cada construcción se describe desde el extremo amino ("n"), al lado izquierdo de la construcción, hasta el extremo carboxi ("c"), al lado derecho de la figura): la construcción (1) (SEQ ID NO: 9) comprendía, n- el dominio VL de Hu2B6, - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu3G8 - y una secuencia del extremo C (LGGC)-c; la construcción (2) (SEQ ID NO: 11) comprendía n- el dominio VL de Hu3G8 - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - y una secuencia del extremo C (LGGC)-c; la construcción (3) (SEQ ID NO: 12) comprendía n- el dominio VL de Hu3G8 - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu3G8 - y una secuencia del extremo C (LGGC)-c; la construcción (4) (SEQ ID NO: 13) comprendía n- el dominio VL de Hu2B6 - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - y una secuencia del extremo C (LGGC)-c.

FIG. 3 Análisis de SDS-PAGE de diacuerpos purificados por afinidad

Los diacuerpos purificados por afinidad se sometieron a análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras (carriles 1-3) o no reductoras (carriles 4-6). Se indican los pesos moleculares aproximados del patrón (entre los carriles 3 y 4). Carriles 1 y 4, CMD de h3G8; carriles 2 y 5, CMD de h2B6; y carriles 3 y 6, CBD de h2B6-h3G8.

FIG. 4 A-B Análisis de SEC de diacuerpos purificados por afinidad

Los diacuerpos purificados por afinidad se sometieron a análisis SEC. (A) Perfil de elución de patrones conocidos: IgG de longitud completa (~150 kDa), fragmento Fab de IgG (~50 kDa) y scFv (~30 kDa); (B) perfil de elución de CMD de h2b6, CMD de h3G8 y CBD de h2B6-h3G8.

FIG. 5 Unión de CBD de h2B6-h3G8 a sCD32B y sCD16A

La unión del h2B6-h3G8 a sCD32B y sCD16A se ensayó en un ELISA emparejado. sCD32B se usó como proteína diana. La segunda sonda fue HRP conjugado a sCD16A. CMD de h3G8, que se une a CD16A, se usó como control.

FIG. 6 A-C Análisis de BIAcore de la unión del diacuerpo a sCD16A, sCD32B y sCD32B

La unión de CBD de h2B6-h3G8 CBD, CMD de h2B6 y CMD h3G8 a sCD16A, sCD32B y sCD32A (control negativo) se ensayó por análisis de SPR. También se ensayó scFv de h3G8 como control. (A) unión a sCD16; (B) unión a sCD32B y (C) unión a sCD32A. Los diacuerpos se inyectaron a una concentración de 100 nM, y scFv a una concentración de 200 nM, sobre las superficies de los receptores a un caudal de 50 ml/min durante 60 s.

FIG. 7 A-E Análisis de BIAcore de la unión del diacuerpo a sCD16A y sCD32B

La unión de h2B6-h3G8 CBD, CMD de h2B6 y CMD h3G8 a sCD16A, y sCD32B se ensayó por análisis de SPR. También se ensayó scFv de h3G8 como control. (A) unión del CMD de h3G8 a sCD16A; (B) unión del CBD de h2B6-h3G8 a sCD16A; (C) unión del scFv de h3G8 a sCD16A; (D) unión del CMD de h2B6 a sCD32B; y (E) unión del CBD de h2B6-h3G8 a sCD32B. Los diacuerpos se inyectaron a concentraciones de 6,25-200 nM sobre las superficies de los receptores a un caudal de 70 ml/min durante 180 s.

FIG. 8 Representación esquemática de la interacción de las cadenas polipeptídicas que comprenden los dominios VL y VH para formar una molécula de diacuerpo biespecífico covalente

NH₂ y COOH representan el extremo amino y el extremo carboxi, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa el resto de cisteína del extremo C en cada cadena polipeptídica. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas y discontinuas son para distinguir entre las dos cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las partes de conector de dichas cadenas. Fv de h2B6 y Fv de h3G8 indican un sitio de unión a epítipo específico para CD32B y CD16, respectivamente.

FIG. 9 Representación esquemática de las cadenas polipeptídicas que contiene dominios Fc de diacuerpos biespecíficos covalentes

La representación de las construcciones polipeptídicas de las moléculas de diacuerpo de la divulgación (cada construcción se describe desde el extremo amino ("n"), al lado izquierdo de la construcción, hasta el extremo carboxi ("c"), al lado derecho de la figura). La construcción (5) (SEQ ID NO: 14) comprendía n- el dominio VL de Hu2B6 - un primer conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu3G8 - un segundo conector (LGGC) - y un dominio Fc en el extremo C de IgG1 humana-c; la construcción (6) (SEQ ID NO: 15) comprendía n- el dominio VL de Hu3G8 - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - y un segundo conector (LGGC) - y un dominio Fc en el extremo C de IgG1 humana-c; la construcción (7) (SEQ ID NO: 16) comprendía n- el dominio VL de Hu2B6 - un primer conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu3G8 - y una secuencia del extremo C (LGGCFNRGEC) (SEQ ID NO: 17)-c; la construcción (8) (SEQ ID NO: 18) comprendía n- el dominio VL de Hu3G8 - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - y un segundo conector (LGGC) - y un dominio de bisagra-Fc del extremo C de IgG1 humana (con la sustitución de aminoácido A215V)-c.

FIG. 10 Unión de moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc a sCD32B y sCD16A

La unión de moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc a sCD32B y sCD16A se ensayó en un ELISA emparedado. Los diacuerpos ensayados se produjeron por 3 sistemas de expresión recombinante: cotransfección de pMGX669 y pMGX674, que expresan las construcciones 1 y 6, respectivamente; cotransfección de pMGX667 y pMGX676, que expresan las construcciones 2 y 5, respectivamente; y cotransfección de pMGX674 y pMGX676, que expresan las construcciones 5 y 6, respectivamente. sCD32B se usó como proteína diana. La sonda secundaria fue HRP conjugado a sCD16A.

FIG. 11 Representación esquemática de la interacción de dos cadenas polipeptídicas que comprenden cada una un dominio Fc para formar un diacuerpo covalente bivalente

NH₂ y COOH representan el extremo amino y el extremo carboxi, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa el al menos un enlace disulfuro entre un resto de cisteína en la segunda secuencia de conector de cada cadena polipeptídica. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas y discontinuas son para distinguir entre las dos cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las partes del primer conector de dichas cadenas. CH2 y CH3 representan los dominios constantes CH2 y CH3 de un dominio Fc. h2B6 Fv y h3G8 Fv indican un sitio de unión a epítipo específico para CD32B y CD16, respectivamente.

FIG. 12 Unión de moléculas de diacuerpo que comprenden los dominios de bisagra/Fc a sCD32B y sCD16A

La unión de moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc a sCD32B y sCD16A se ensayó en un ELISA emparedado. Los diacuerpos ensayados se produjeron por 4 sistemas de expresión recombinante: cotransfección de pMGX669 + pMGX674, que expresan las construcciones 1 y 6, respectivamente; cotransfección de pMGX669 + pMGX678, que expresan las construcciones 2 y 8, respectivamente; cotransfección de pMGX677 + pMGX674, que expresan las construcciones 7 y 6, respectivamente y cotransfección de pMGX677+ pMGX678, que expresan las

construcciones 7 y 8 respectivamente. sCD32B se usó como proteína diana. La sonda secundaria fue HRP conjugado a sCD16A.

FIG. 13 Representación esquemática de la interacción de las cadenas polipeptídicas para formar una molécula de diacuerpo tetramérica

- 5 NH₂ y COOH representan el extremo amino y el extremo carboxi, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa el al menos un enlace disulfuro entre un resto de cisteína en la segunda secuencia de conector de la cadena polipeptídica "más pesada" que alberga Fc y un resto de cisteína en la secuencia del extremo C de la cadena polipeptídica "más ligera" que no alberga Fc. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas y discontinuas son para distinguir entre cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las partes del primer conector de dichas cadenas más pesadas y el conector de dichas cadenas más ligeras. CH2 y CH3 representan los dominios constantes CH2 y CH3 de un dominio Fc. h2B6 Fv y h3G8 Fv indican un sitio de unión a epítipo específico para CD32B y CD16, respectivamente.

FIG. 14 Representación esquemática de cadenas polipeptídicas que contiene dominios Fc que forman diacuerpos biespecíficos covalentes

- 15 Representación de construcciones polipeptídicas que forman las moléculas de diacuerpo de la divulgación (cada construcción se describe desde el extremo amino ("n"), al lado izquierdo de la construcción, hasta el extremo carboxi ("c"), al lado derecho de la figura). La construcción (9) (SEQ ID NO: 19) comprendía n-un dominio de bisagra/Fc de IgG1 humana - el dominio VL de Hu3G8 - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10))- y una secuencia LGGC del extremo C-c; la construcción (10) (SEQ ID NO: 20) comprendía n-un dominio de Fc de IgG1 humana - el dominio VL de Hu3G8 - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10))- y una secuencia LGGC del extremo C-c; la construcción (11) (SEQ ID NO: 21) comprendía n- el dominio VL de Hu2B6 (G105C) - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) - el dominio VH de Hu3G8 - y un dominio de bisagra/Fc del extremo C de IgG1 humana con la sustitución de aminoácido A215V-c; la construcción (12) (SEQ ID NO: 22) comprendía n- el dominio VL de Hu3G8 - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 (G44C) - y una secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23) del extremo C-c.

FIG. 15 A-B SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western de diacuerpos tetraméricos de afinidad

- Los diacuerpos producidos por sistemas de expresión recombinantes cotransfectado con vectores que expresan las construcciones 10 y 1, las construcciones 9 y 1 y las construcciones 11 y 12 se sometieron a análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras (A) y análisis de transferencia de Western usando anticuerpo de cabra anti-IgG1 H+L humana como sonda (B). Las proteínas en el gel SDS-PAGE se visualizaron con Simply Blue Safestain (Invitrogen). Para ambos paneles A y B, las moléculas de diacuerpo que comprenden las construcciones 10 y 1, las construcciones 9 y 1 y las construcciones 11 y 12A están en los carriles 1, 2 y 3, respectivamente.

- FIG. 16 Unión de moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc y enlaces disulfuro intercatenarios genomanipulados a sCD32B y sCD16A

- La unión de moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc y enlaces disulfuro genomanipulados entre las cadenas polipeptídicas "más ligeras" y "más pesadas" a sCD32B y sCD16A se ensayó en un ELISA emparejado. Los diacuerpos ensayados se produjeron por 3 sistemas de expresión recombinante: construcciones de expresión 1 y 10, construcciones de expresión 1 y 9 y construcciones de expresión 11 y 12, respectivamente. sCD32B se usó como proteína diana. La sonda secundaria fue HRP conjugado a sCD16A. La unión de h3G8 se usó como control.

FIG. 17 Representación esquemática de precursores de poliproteína de molécula de diacuerpo y representación esquemática de cadenas polipeptídicas que contienen cadena ligera lambda y/o dominios de bisagra

- Representación de las construcciones polipeptídicas que comprenden las moléculas de diacuerpo de la divulgación (cada construcción se describe desde el extremo amino ("n"), al lado izquierdo de la construcción, hasta el extremo carboxi ("c"), al lado derecho de la figura). La construcción (13) (SEQ ID NO: 95) comprendía n- el dominio VL de 3G8 - un primer conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de 2.4G2VH - un segundo conector (LGGC)- sitio de reconocimiento de furina (RAKR (SEQ ID NO: 93))-dominio VL de 2.4G2 - un tercer conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10))-el dominio VH de 3G8 - y un dominio LGGC del extremo C; (la secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 95 se proporciona en la SEQ ID NO: 96). La construcción (14) (SEQ ID NO: 97) comprendía n- el dominio VL de 3G8 - un primer conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de 2.4G2VH - un segundo conector (LGGC)- sitio de reconocimiento de furina (RAKR (SEQ ID NO: 93))-sitio FMD (proteasa C3 del virus de la enfermedad glosopeda)- el dominio VL de 2.4G2 - un tercer conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10))-el dominio VH de 3G8 - y un dominio LGGC del extremo C; (la secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 97 se proporciona en la SEQ ID NO: 98). La construcción (15) (SEQ ID NO: 99) comprendía n- el dominio VL de Hu2B6 - un conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu3G8 - y un dominio FNRGEC (SEQ ID NO: 23) del extremo C; (La secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 99 se proporciona en la SEQ ID NO: 100). La construcción (16) (SEQ ID NO: 101) comprendía n-el dominio VL de Hu3G8 -

un conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - y un dominio VEPKSC (SEQ ID NO: 77) del extremo C; (la secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 101 se proporciona en la SEQ ID NO: 102).

FIG. 18 Unión de moléculas de diacuerpo derivadas de una molécula precursora de poliproteína a mCD32B y sCD16A

- 5 La unión de las moléculas de diacuerpo derivadas de construcción 13 de la molécula precursora de poliproteína (SEQ ID NO: 95) a CD32B murina (mCD32B) y CD16A soluble (sCD16A) se ensayó en un ELISA emparedado. mCD32B se usó como proteína diana. La sonda secundaria fue biotina conjugada sCD16A.

FIG. 19 Unión de moléculas de diacuerpo que comprenden la cadena lambda y/o los dominios de bisagra a sCD32B y sCD16A

- 10 La unión de moléculas de diacuerpo que comprenden dominios derivados del extremo C de la cadena ligera lambda human y el dominio de bisagra de IgG a sCD32B y sCD16A se ensayó y comparó con el diacuerpo que comprende las construcciones 1 y 2 (figura 5) en un ELISA emparedado. Los diacuerpos ensayados se produjeron por el sistema de expresión recombinante que expresa las construcciones 15 y 16 (SEQ ID NO: 99 y SEQ ID NO: 101, respectivamente). sCD32B se usó como proteína diana. La sonda secundaria fue HRP conjugado a sCD16A. Las barras con recuadros pequeños representan la combinación de construcciones 15/16 mientras que las barras con recuadros grandes representan la combinación de construcciones 1/2.

FIG. 20 Representación esquemática de 2B6/4420 DART unido a CD32B ubicado en la superficie de una célula y una molécula conjugada con fluoresceína

- 20 El diagrama muestra la flexibilidad del brazo antifluoresceína "adaptador universal" del DART, así como la posibilidad de sustituir otras especificidades en el brazo de 2B6. Las regiones V se muestran como recuadros, los conectores GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) se muestran como líneas, el enlace disulfuro se muestra conectando las dos cadenas. Los constituyentes de una cadena se muestran en azul mientras que el otro está de color rosa. N, extremo amino; C, extremo carboxi; FL fluoresceína, VL región variable de cadena ligera; VH región variable de cadena pesada.

- 25 FIG. 21 (Paneles A y B) El 2B6/4420 DART se une específicamente a moléculas conjugadas con fluoresceína y puede unirse simultáneamente a CD32B.

- 30 (A) 2B6/4420 o 2B6/3G8 se unieron a placas de ELISA recubiertas con FITC-proteína S. La unión y función del brazo de 2B6 se detectó por acoplamiento de CD32B soluble, seguida de un anticuerpo específico por CD32B y un anticuerpo de detección secundario conjugado con HRP. (B) 2B6/4420 o 2B6/3G8 se unieron a placas de ELISA recubiertas con HulgG o FITC-HulgG (conjugado con fluoresceína). La unión se detectó por acoplamiento con un suero policlonal específico para 2B6 Fv seguido de un anticuerpo secundario conjugado con HRP.

FIG. 22 (Paneles A y B) Activación de linfocitos B purificados usando anticuerpos anti-CD79B humana.

- 35 Los linfocitos B purificados se activaron usando concentraciones crecientes de anticuerpos anti-CD79b humana conjugado con FITC, CB3.1-FITC (A) o CB3.2-FITC (B) y 50 µg/ml del fragmento F(ab')₂ de Fc de IgG GAM específico (eje de abscisas). Los linfocitos B se activaron en presencia de PBS (barras blancas) o 5 µg/ml de αFITCαCD32BDART (barras negras) o αCD16αCD32BDART (barras grises). Las reacciones se realizaron por triplicado y se calcularon las desviaciones típicas.

FIG. 23 (Paneles A y B) Activación de linfocitos B purificados

- 40 Los linfocitos B purificados de un segundo donador sano se activaron como se describe en la figura 22, panel B. El índice de proliferación se midió en células activadas en presencia del anticuerpo anti-CD79b conjugado con FITC CB3.2-FITC (A) y se comparó con el índice de proliferación de células activadas en presencia de anticuerpo CB3.2 no marcado (B).

FIG. 24 (Paneles superior e inferior) Reducción de linfocito B de ratón *in vivo* en ratones transgénicos HCD16A/B usando MGD261

- 45 A ratones mCD32^{-/-} hCD16A⁺ C57B1/6, mCD32^{-/-} hCD32B⁺ C57B1/6 y mCD32^{-/-} hCD16A⁺ hCD32B⁺ C57B1/6 de la colonia de cría MacroGenics se les inyectó IV en los días 0, 3, 7, 10, 14 y 17 MGD261 (10, 3, 1 o 0,3 mg/kg), o un anticuerpo irrelevante (hE16 10 mg/kg). Se recogió sangre en los días -19 (antes de la exanguinación) 4, 11, 18, 25 y 32 para análisis FACS. La salud del animal y la actividad se registraron tres veces a la semana. Panel superior: h2B6-3G8 y mAb WNV; Panel inferior: ratones h2B6-3G8 -hCD16A o -hCD32B y ratones mAb WNV -hCD16A o -hCD32B.

FIG. 25 Reducción de linfocitos B de ratón *in vivo* en ratones transgénicos HCD16A/B usando DB 2.4G2-3G8

A ratones mCD16^{-/-}, mCD16^{-/-} hCD16A⁺ C57B1/6, mCD16^{-/-} hCD16B⁺ y mCD16^{-/-} hCD16A⁺ hCD16B⁺ de la colonia de cría MacroGenics se les inyectó IP en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 DB 2.4G2-3G8 (75 ug/ratón), o PBS. Se recogió sangre en los días -10 (antes de la exanguinación) 4, 11 y 18 para análisis FACS. La salud del animal y la actividad se registraron tres veces a la semana.

- 5 FIG. 26 Demostración de actividad antitumoral de MGD261 usando un modelo intravenoso (IV) de la línea de células tumorales humana Raji.

A ratones mCD16^{-/-}, hCD16A⁺, RAG1^{-/-} C57B1/6 de doce-veinte semanas de edad de la colonia de cría MacroGenics se les inyectó IV en el día 0 5×10^6 células Raji. En los días 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 y 30 los ratones también se trataron por vía intraperitoneal (IP) con 250, 25 o 2,5 ug de MGD261 o con PBS (control negativo). Los ratones entonces se observaron diariamente y se registró el peso corporal dos veces a la semana. Los ratones que desarrollaban parálisis de las extremidades posteriores se sacrificaron.

- 10

FIG. 27 Expresión de DART en un hospedador que no es mamífero

Las células BL21DE3 (Novagen) se transformaron con el plásmido pET25b(+) *T7-lac+* 3G8/3G8 y se usó una colonia resistente a amp para sembrar el caldo de cultivo. Cuando el cultivo alcanzó 0,5 unidades de DO 600, se añadió IPTG 0,5 mM para inducir la expresión. El cultivo se cultivó a 30 °C durante 2 horas y se recogió el medio sin células.

- 15

FIG. 28 ELISA de DART

Se realizó ELISA de unión a DART h3G8-h3G8 usando placas Maxisorp de 96 pocillos. Después de la reacción, la placa se lavó con PBS-T tres veces y se reveló con 80 µl/pocillo de sustrato TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo mediante 40 µl/pocillo de H₂SO₄ al 1 %. La DO 450 nm se leyó usando un lector de placa de 96 pocillos y el programa informático SOFTmax. La lectura se representó usando el programa informático GraphPadPrism 3.03.

- 20

FIG. 29 Muerte de linfocitos B humanos inducida por DART

Se incubaron PBMC humanos durante una noche con las moléculas indicadas. La apoptosis se ensayó por análisis FACS como el porcentaje de la población PI⁺Anexina-V⁺ de linfocitos B (células CD20⁺) en la población total no seleccionada FSC/SSC.

- 25

FIG. 30 Construcciones de DART 8B5-CB3.1

Se produjeron múltiples construcciones de DART 8B5-CB3.1 DART para ilustrar la presente divulgación. La construcción 5 y 6, o 6 y 7, u 8 y 9, o 9 y 10, codificadas en plásmidos de expresión se cotransfectaron en células HEK-293 para expresar DART 8B5-CB3.1 con o sin marca antíflag usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). El medio acondicionado se recogió cada tres días por tres veces. El medio acondicionado entonces se purificó usando columna de afinidad por CD32B.

- 30

FIG. 31 ELISA de DART 8B5-CB3.1

Se realizó ELISA de competición de DART 8B5-CB3.1/ch8B5 usando placas Maxisorp de 96 pocillos. Después de la reacción, la placa se lavó con PBS-T tres veces y se reveló con 80 µl/pocillo de sustrato TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo mediante 40 µl/pocillo de H₂SO₄ al 1 %. La DO 450 nm se leyó usando un lector de placa de 96 pocillos y el programa informático SOFTmax. La lectura se representó usando el programa informático GraphPadPrism 3.03.

- 35

FIG. 32 Ilustración esquemática de la estructura DART tetravalente

Ilustra la estructura general de una especie de DART producida mediante ensamblaje de cuatro cadenas polipeptídicas. Los cuatro dominios de unión a antígeno del DART del tipo Ig se muestran como elipses con bandas y gris oscuro.

- 40

FIG. 33 DART tetravalente de tipo Ig

Proporciona un esquema de los sitios de unión a epítopo de un DART tetravalente de tipo Ig.

- 45 FIG. 34 ELISA de unión de mCD32-hCD16A

Proporciona los resultados de los ELISA que demuestran que la especie de DART tetravalente de tipo Ig del ejemplo 6.10 se une al antígeno con mayor afinidad que el anticuerpo de control (mAb chmCD32) u otras especies de DART.

FIG. 35 Ilustración esquemática de moléculas de DART de Ig

Proporciona un esquema de moléculas de DART de Ig. La especificidad se indica por regiones con sombreado, patrón o de color blanco, las regiones constantes se muestran en negro y los enlaces disulfuro se indican por líneas negras de puntos. Los extremos N de todas las cadenas proteínicas están orientadas hacia la parte superior de la figura, mientras que los extremos C de todas las cadenas proteínicas están orientadas hacia la parte inferior de la figura. Las ilustraciones A-E son biespecíficas y las ilustraciones F-J son trispecíficas. Las ilustraciones A y E son tetravalentes. Las ilustraciones B, C, F, I y J son hexavalentes. Las ilustraciones D, G y H son octavalentes. Remítase a las figuras 1, 2, 9, 14 y 17 y a la sección 3.1 para descripciones detalladas de los dominios individuales.

FIG. 36 Capacidad de unión del diacuerpo biespecífico Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1

La figura 36 muestra la capacidad del diacuerpo biespecífico Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1 (cuadrados) de unirse a CD32b y CD16a con respecto a los diacuerpos Hu2B6 4.5 o Hu3G8 5.1 (triángulos).

FIG. 37 Esquema de derivados de DART de enrollamiento-E y enrollamiento-K

La figura 37 ilustra la conformación general de derivados de DART de enrollamiento-E y enrollamiento-K.

FIG. 38 Disposición de hélices de separadores de enrollamiento-E y enrollamiento-K preferidos

La figura 38 muestra la disposición de las hélices de la secuencia de "enrollamiento-E" preferida (EVAALEK)₄ (SEQ ID NO: 299 y la secuencia de "enrollamiento-K" preferida (KVAALKE)₄ (SEQ ID NO: 300).

FIG. 39 Derivados de DART que contienen Fc de enrollamiento-E y enrollamiento-K

La figura 39 ilustra las diferentes especies de derivados de DART que contienen Fc de enrollamiento-E y enrollamiento-K que pueden formarse mediante intercambio de cadenas.

FIG. 40 Cromatografía de exclusión molecular en derivados de enrollamiento-E y/o enrollamiento-K y derivados que contienen Fc de enrollamiento-E y/o enrollamiento-K de DART h2B6YAhCB3

La figura 40 muestra los resultados de la cromatografía de exclusión molecular sobre derivados de enrollamiento-E y/o enrollamiento-K y derivados que contienen Fc de enrollamiento-E y/o enrollamiento-K de DART h2B6YAhCB3. Se analizaron cuatro especies de dichas moléculas; todas tenían un enrollamiento-E y un enrollamiento-K: EK (sin región Fc), 2,1 mg; EFc/K (Fc ligado a enrollamiento-E), 2,7 mg; E/KFc (Fc ligado a enrollamiento-K), 1,8 mg; EFc/KFc (Fc ligado al enrollamiento-K y el enrollamiento-E del mismo DART), 2,0 mg.

FIG. 41 Estructura de moléculas diméricas producidas

La figura 41 muestra la posible estructura de la molécula dímera producida identificada en el cromatograma de exclusión molecular de la figura 40.

FIG. 42 Análisis electroforético en gel de SDS-poliacrilamida de los derivados de enrollamiento-E y/o enrollamiento-K y derivados que contienen Fc de enrollamiento-E y/o enrollamiento-K de DART h2B6YAhCB3

La figura 42 muestra los resultados de un análisis electroforético en gel de SDS-poliacrilamida de las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular (figura 40) de derivados de enrollamiento-E y/o enrollamiento-K y derivados que contienen Fc de enrollamiento-E y/o enrollamiento-K de DART h2B6YAhCB3. Carriles flanqueantes: controles de marcador molecular; carril 1: EK (sin región Fc); carril 2: EFc/K, fracción agregada; carril 3: EFc/K, fracción monomérica; carril 4: E/KFc, fracción agregada; carril 5: E/KFc, fracción monomérica; carril 6: EFc/KFc, fracción agregada; carril 7: EFc/KFc, fracción dimérica; carril 8: EFc/KFc, fracción monomérica.

FIG. 43 Análisis de ELISA de unión biespecífica de

La figura 43 muestra el resultado de un ELISA de unión biespecífica que compara derivados de DART h2B6YAhCB3 que contienen Fc de enrollamiento-E / enrollamiento-K (EFc/K o E/KFc), DART h2B6YAhCB3, control y un derivado de DART h2B6YAhCB3 EFc/KFc.

FIG. 44 Capacidad de los derivados de enrollamiento-E y/o enrollamiento-K y derivados que contienen Fc de enrollamiento-E y/o enrollamiento-E y/o enrollamiento-K de DART h2B6YAhCB3 de inhibir la proliferación de linfocitos T

La figura 44 muestra la capacidad de los derivados de enrollamiento-E y/o enrollamiento-K y derivados que contienen Fc de enrollamiento-E y/o enrollamiento-K de DART h2B6YAhCB3 de inhibir la proliferación de linfocitos T.

FIG. 45 ABD-DART hCD16-hCD32B

La figura 45 muestra un esquema de una molécula de anticuerpo recombinante, ABD-DART hCD16-hCD32B compuesto del dominio ABD3 de la proteína G de estreptococos fusionado a un DART biespecífico recombinante que es inmunorreactivo con los antígenos hCD16 y hCD32B.

FIG. 46A/46B Afinidad de unión de ABD-DART hCD16-hCD32B usando ELISA específico doble

- 5 Se recubrieron placas de ELISA con antígeno CD16 (figura 46A) o seroalbúmina humana (figura 46B) a una concentración de 2 µg/ml. Se unieron concentraciones variables de ABD-DART hCD16-hCD32B (■) y DART hCD16-hCD32B de control (○) empezando con 2 µg/ml. Se añadió antígeno sCD32B biotinilado a la placa seguido de HRP conjugado con estreptavidina para la detección.

FIG. 47 Citotoxicidad mediada por PBMC de proteínas de DART

- 10 Citotoxicidad mediada por PBMC de proteínas de DART. Se realizaron ensayos de ADCC usando líneas de linfocitos B humanos, Daudi como células diana incubadas con PBMC como células efectoras. Se hicieron ensayos individuales por triplicado a una relación de efector a diana de 20:1 y una titulación de anticuerpos: DART hCD16A-hCD32B (●) y ABD DART hCD16A-hCD32B (■). La citotoxicidad celular se midió por ensayo de liberación de LDH. La curva inferior a 10^0 es ABD DART hCD16A-hCD32B (■).

- 15 FIG. 48 Propiedades farmacocinéticas mejoradas de ABD-DART hCD16-hCD32B en ratones C57B1/6

A ratones (n=3) se les inyectó una única inyección intravenosa de (A) ABD-DART hCD16-hCD32B (●) y (B) DART hCD16-hCD32B (▲) a 5 mg/kg. Se recogió suero de ratón en diversos puntos temporales y se cuantificaron las concentraciones de proteína en suero por ELISA. Se realizaron cálculos farmacocinéticos usando WinNonlin Professional 5.1.

- 20 FIG. 49A-E Actividad de DART HER2 x TCRb sobre un panel de líneas celulares que expresan bajo contenido de HER2

Se ensayaron moléculas de DART que tienen dominios de unión a Her2 y receptor de linfocitos T (TCR) para su capacidad de mediar la citotoxicidad en múltiples líneas celulares de cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de vejiga que se habían caracterizado previamente por mostrar bajos niveles de expresión de HER2 (y, por tanto, que son resistentes a tratamiento con el anticuerpo anti-Her2/neu, Herceptin®. Las líneas celulares de cáncer de mama ensayadas son ZR75-1 (HER2 2+) (figura 49A), MCF-7 (HER2 1+) (figura 49B) y MDA-MB468 (HER2-ve) (figura 49C). Las líneas celulares que no son de cáncer de mama ensayadas son HT-29 (línea celular de cáncer de colon) (figura 49D) y SW780 (línea celular de cáncer de vejiga) (figura 49E).

5. Descripción de las realizaciones preferidas

- 30 Cada cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo comprende un dominio VL y un dominio VH, que están unidos covalentemente de modo que los dominios tengan limitado su autoensamblaje. La interacción de dos de las cadenas polipeptídicas producirá dos emparejamientos VL-VH, formando dos sitios de unión a epítopo, es decir, una molécula bivalente. Cuando los dominios VL y VH se obtienen del mismo anticuerpo, las dos cadenas polipeptídicas complementarias pueden ser idénticas. Por ejemplo, cuando los dominios de unión se obtienen de un anticuerpo específico por epítopo A (es decir, el dominio de unión se forma a partir de una interacción de VL_A-VH_A, cada polipéptido comprenderá un VH_A y un VL_A. La homodimerización de dos cadenas polipeptídicas del anticuerpo provocará la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_A, provocando un anticuerpo monoespecífico bivalente. Cuando los dominios VL y VH se obtienen de anticuerpos específicos para antígenos diferentes, la formación de un diacuerpo biespecífico funcional requiere la interacción de dos cadenas polipeptídicas diferentes, es decir, la formación de un heterodímero. Por ejemplo, para un diacuerpo biespecífico, una cadena polipeptídica comprenderá un VL_A y un VL_B; la homodimerización de dicha cadena provocará la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_B, sin unión o de unión impredecible. Por el contrario, cuando dos cadenas polipeptídicas diferentes pueden interactuar libremente, por ejemplo, en un sistema de expresión recombinante, comprendiendo una un VL_A y un VH_B y comprendiendo la otra un VL_B y un VH_A, se formarán dos sitios de unión diferentes: VL_A-VH_A y VL_B-VH_B. Para todos los pares de cadenas polipeptídicas de diacuerpo, la posibilidad de alineación incorrecta o unión incorrecta de las dos cadenas es una posibilidad, es decir, la interacción de dominios VL-VL o VH-VH; sin embargo, la purificación de diacuerpos funcional se controla fácilmente basándose en la inmunospecificidad del sitio de unión dimerizado apropiadamente usando cualquier método basado en afinidad conocido o ejemplificado en la presente memoria, por ejemplo, cromatografía de afinidad.
- 50 En otras realizaciones, una o más de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprende un dominio Fc. Los dominios Fc en las cadenas polipeptídicas de las moléculas de diacuerpo dimerizan preferentemente, provocando la formación de una molécula de diacuerpo que muestra propiedades de tipo inmunoglobulina, es decir interacciones de Fc-FcγR. Los diacuerpos que comprende Fc pueden ser dímeros, por ejemplo, compuestos de dos cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada uno un dominio VH, un dominio VL y un dominio Fc. La dimerización de dichas cadenas polipeptídicas provoca un diacuerpo bivalente que comprende un dominio Fc, aunque con una estructura distinta de la de un anticuerpo bivalente no modificado (figura 11). Dichas moléculas de diacuerpo mostrarán

fenotipos alterados con respecto a una inmunoglobulina de tipo silvestre, por ejemplo, semivida en suero alterada, propiedades de unión, etc. En otras realizaciones, las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc pueden ser tetrámeros. Dichos tetrámeros comprenden dos cadenas polipeptídicas "más pesadas", es decir, una cadena polipeptídica que comprende un dominio VL, uno VH y uno Fc, y dos cadenas polipeptídicas "más ligeras", es decir, cadena polipeptídica que comprende un VL y un VH. Dichas cadenas más ligeras y más pesadas interactúan formando un monómero, y dichos monómeros interactúan mediante sus dominios Fc sin emparejar para formar una molécula de tipo Ig. Dicho diacuerpo de tipo Ig es tetravalente y puede ser monoespecífico, biespecífico o tetraespecífico.

Los al menos dos sitios de unión de la molécula de diacuerpo pueden reconocer el mismo epítipo o diferentes. Los epítipos diferentes pueden ser del mismo antígeno o epítipos de diferentes antígenos. En una realización, los epítipos son de diferentes células. En otra realización, los epítipos son antígenos de superficie celular en la misma célula o virus. Los sitios de unión a epítipo pueden reconocer cualquier antígeno contra el que pueda generarse un anticuerpo. Por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, toxinas bacterianas, marcadores de superficie celular, marcadores autoinmunitarios, proteínas víricas, fármacos, etc. En aspectos particulares, al menos un sitio de unión a epítipo del diacuerpo es específico para un antígeno en una célula particular, tal como un linfocito B, o linfocito T, una célula fagocítica, un linfocito citolítico natural (NK) o una célula dendrítica.

Cada dominio de la cadena polipeptídica del diacuerpo, es decir, el dominio VL, VH y Fc, puede estar separado por un conector peptídico. El conector peptídico puede ser de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 aminoácidos. En determinadas realizaciones, la secuencia conectora de aminoácidos es GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) codificada por la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 74).

En determinadas realizaciones, cada cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo se genomanipula para que comprenda al menos un resto de cisteína que interactuará con al menos un resto de cisteína equivalente en una segunda cadena polipeptídica de la divulgación para formar un enlace disulfuro intercatenarior. Dichos enlaces disulfuro intercatenarios sirven para estabilizar la molécula de diacuerpo, mejorando la expresión y recuperación en sistemas recombinantes, provocando una formulación estable y coherente, así como mejorando la estabilidad del producto aislado y/o purificado *in vivo*. Dicho al menos un resto de cisteína puede introducirse como un único aminoácido o como parte de una secuencia de aminoácidos más grande, por ejemplo, dominio de bisagra, en cualquier parte de la cadena polipeptídica. En una realización específica, dicho al menos un resto de cisteína se genomanipula para que se produzca en el extremo C de la cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos LGGC. En una realización específica, el extremo C de la cadena polipeptídica que comprende la molécula de diacuerpo de la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos LGGC. En otra realización, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en el polipéptido dentro de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de bisagra, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4. En una realización específica, el extremo C de una cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo de la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio de bisagra de IgG, por ejemplo, SEQ ID NO: 1. En otra realización, el extremo C de una cadena polipeptídica de una molécula de diacuerpo de la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 78). En otras realizaciones, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC (SEQ ID NO: 17), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 76). En una realización específica, el extremo C de la cadena polipeptídica que comprende el diacuerpo de la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC (SEQ ID NO: 17), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 76). En otras realizaciones más, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO: 23), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 75). En una realización específica, el extremo C de una cadena polipeptídica que comprende el diacuerpo de la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO: 23), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 75).

En determinadas realizaciones, la molécula de diacuerpo comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una de ellas la secuencia de aminoácidos LGGC y estando unida covalentemente por un enlace disulfuro entre los restos de cisteína en dichas secuencias LGGC. En otra realización específica, la molécula de diacuerpo comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, comprendiendo una de ellas la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23) mientras la otra comprende un dominio de bisagra (que contiene al menos un resto de cisteína), en la que dichas al menos dos cadenas polipeptídicas están unidas covalentemente por un enlace disulfuro entre el resto de cisteína en FNRGEC (SEQ ID NO: 23) y un resto de cisteína en el dominio de bisagra. En aspectos particulares, el resto de cisteína responsable del enlace disulfuro ubicado en el dominio de bisagra es Cys-128 (numerado de acuerdo con Kabat EU; ubicado en el dominio de bisagra de una cadena pesada de IgG intacta sin modificar) y el resto de cisteína equivalente en la SEQ ID NO: 23 es Cys-214 (numerada de acuerdo con Kabat EU; ubicada en el extremo C de una cadena ligera de IgG intacta sin modificar) (Elkabetz *et al.* (2005) "*Cysteines In CH1 Underlie Retention Of Unassembled Ig Heavy Chains*", J. Biol. Chem. 280:14402-14412). En otras realizaciones más, el al menos un resto de cisteína se genomanipula para que se produzca en el extremo N de la cadena de aminoácidos. En otras realizaciones más, el al menos un resto de cisteína se genomanipula para que se produzca en la parte de conector de la cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo. En realizaciones adicionales, el

dominio VH o VL se genomanipula para que comprenda al menos una modificación de aminoácido con respecto al dominio VH o VL precursor de modo que dicha modificación de aminoácido comprende una sustitución de un aminoácido precursor con cisteína.

La divulgación abarca moléculas de diacuerpo que comprenden un dominio Fc o parte del mismo (por ejemplo, un dominio CH2 o dominio CH3). El dominio Fc o parte del mismo puede obtenerse de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina incluyendo, aunque sin limitación, IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En realizaciones preferidas, el dominio Fc (o parte del mismo) se obtiene de IgG. En realizaciones específicas el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o un alotipo de los mismos. En una realización, la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc, que es un dominio Fc que comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 independientemente seleccionados de cualquier isotipo de inmunoglobulina (es decir, un dominio Fc que comprende el dominio CH2 obtenido de IgG y el dominio CH3 obtenido de IgE, o el dominio CH2 obtenido de IgG1 y el dominio CH3 obtenido de IgG2, etc.). Dicho dominio de Fc puede genomanipularse en una cadena polipeptídica que comprende la molécula de diacuerpo de la divulgación en cualquier posición con respecto a otros dominios o partes de dicha cadena polipeptídica (por ejemplo, el dominio Fc o parte del mismo, puede estar en el extremo C tanto de los dominios VL como VH del polipéptido de la cadena; puede estar en el extremo N tanto de los dominios VL como VH; o puede estar en el extremo N de un dominio y en el extremo C del otro (es decir, entre dos dominios de la cadena polipeptídica)).

La presente divulgación también abarca moléculas que comprenden un dominio de bisagra. El dominio de bisagra puede obtenerse de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina incluyendo IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En realizaciones preferidas, el dominio de bisagra se obtiene de IgG, en el que el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un alotipo de los mismos. Dicho dominio de bisagra puede genomanipularse en una cadena polipeptídica que comprende la molécula de diacuerpo junto con un dominio Fc de modo que la molécula de diacuerpo comprenda un dominio de bisagra-Fc. En determinadas realizaciones, el dominio de bisagra y Fc se seleccionan independientemente de cualquier isotipo de inmunoglobulina conocido en la técnica o ejemplificado en la presente memoria. En otras realizaciones, el dominio de bisagra y Fc están separados por al menos otro dominio de la cadena polipeptídica, por ejemplo, el dominio VL. El dominio de bisagra, u opcionalmente el dominio de bisagra-Fc, puede genomanipularse en un polipéptido de la divulgación en cualquier posición con respecto a otros dominios o partes de dicha cadena polipeptídica. En determinadas realizaciones, una cadena polipeptídica de la divulgación comprende un dominio de bisagra, que es un dominio de bisagra que está en el extremo C de la cadena polipeptídica, en la que dicha cadena polipeptídica no comprende un dominio Fc. En otras realizaciones más, una cadena polipeptídica de la divulgación comprende un dominio de bisagra-Fc, que es un dominio de bisagra-Fc que está en el extremo C de la cadena polipeptídica. En realizaciones adicionales, una cadena polipeptídica de la divulgación comprende un dominio de bisagra-Fc, que es un dominio de bisagra-Fc que está en el extremo N de la cadena polipeptídica.

Como se analiza anteriormente, la divulgación abarca multímeros de cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una de estas cadenas polipeptídicas un dominio VH y VL. En determinados aspectos, las cadenas polipeptídicas en dichos multímeros comprenden además un dominio Fc. La dimerización de los dominios Fc da lugar a la formación de una molécula de diacuerpo que muestra funcionalidad de tipo inmunoglobulina, es decir, función mediada por Fc (por ejemplo, interacción de Fc-FcγR, unión al complemento, etc.). En determinadas realizaciones, los dominios VL y VH que comprende cada cadena polipeptídica tienen la misma especificidad, y dicha molécula de diacuerpo es bivalente y monoespecífica. En otras realizaciones, los dominios VL y VH que comprende cada cadena polipeptídica tienen diferente especificidad y el diacuerpo es bivalente y biespecífico.

En otras realizaciones más, las moléculas de diacuerpo de la divulgación abarcan tetrámeros de cadena polipeptídicas, comprendiendo cada una de estas cadenas polipeptídicas un dominio VH y VL. En determinadas realizaciones, dos cadenas polipeptídicas del tetrámero comprenden además un dominio Fc. El tetrámero, por lo tanto, está compuesto de dos cadenas polipeptídicas "más pesadas", comprendiendo cada una un dominio VL, VH y Fc, y dos cadenas polipeptídicas "más ligeras", que comprenden un dominio VL y VH. La interacción de una cadena más pesada y una más ligera en un monómero bivalente acoplado con dimerización de dichos monómeros mediante los dominios Fc de las cadenas más pesadas dará lugar a la formación de una molécula de tipo inmunoglobulina tetravalente (ejemplificada en el ejemplo 6.2 y el ejemplo 6.3). En determinados aspectos, los monómeros son iguales, y la molécula de diacuerpo tetravalente es monoespecífica o biespecífica. En otros aspectos, los monómeros son diferentes, y la molécula tetravalente es biespecífica o tetraespecífica.

La formación de una molécula de diacuerpo tetraespecífica como se describe *supra* requiere la interacción de cuatro cadenas polipeptídicas diferentes. Dichas interacciones son difíciles de conseguir con eficacia dentro de un sistema de producción recombinante de una célula, debido a las muchas variantes de emparejamientos incorrectos de cadenas potenciales. Una solución para aumentar la probabilidad de emparejamientos incorrectos es genomanipular mutaciones de tipo "botones en ojales" en los pares de cadenas polipeptídicas deseados. Dichas mutaciones favorecen la heterodimerización sobre la homodimerización. Por ejemplo, con respecto a las interacciones de Fc-Fc, una sustitución de aminoácido (preferiblemente una sustitución con un aminoácido que comprende un grupo lateral voluminoso que forma un "botón", por ejemplo, triptófano) puede introducirse en el dominio CH2 o CH3 de modo que la interferencia estérica impida la interacción con un dominio mutado de forma similar y obligue al dominio mutado a emparejarse con un dominio en que se haya genomanipulado una mutación complementaria o de acomodación, es

decir, "el ojal" (por ejemplo, una sustitución con glicina). Dichos conjuntos de mutaciones pueden genomanipularse en cualquier par de polipéptidos que comprenda la molécula de diacuerpo y, además, pueden genomanipularse en cualquier parte de las cadenas polipeptídicas de dicho par. Los métodos de genomanipulación de proteínas para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización son bien conocidos en la técnica, en particular con respecto a la genomanipulación de moléculas de tipo inmunoglobulina, y se incluyen en la presente memoria (véase, por ejemplo, Ridgway *et al.* (1996) "*Knobs-Into-Holes Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization*," Protein Engr. 9:617-621, Atwell *et al.* (1997) "*Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library*," J. Mol. Biol. 270: 26-35 y Xie *et al.* (2005) "*A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis*," J. Immunol. Methods 296:95-101).

También se describen moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc variantes o dominios de bisagra-Fc variantes (o parte de los mismos), comprendiendo dicho dominio Fc variante al menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) con respecto a un dominio Fc de tipo silvestre comparable o dominio de bisagra-Fc (o parte del mismo). Las moléculas que comprenden dominios Fc variantes o dominios de bisagra-Fc (o parte de los mismos) (por ejemplo, anticuerpos) normalmente tienen fenotipos alterados con respecto a moléculas que comprenden dominios Fc de tipo silvestre o dominios de bisagra-Fc o partes de los mismos. El fenotipo variante puede expresarse como semivida en suero alterada, estabilidad alterada, susceptibilidad alterada a enzimas celulares o función efectora alterada ensayada en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófagos. Las variantes del dominio Fc identificadas que alteran la función efectora se divulgan en la solicitud internacional WO 04/063351, las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos 2005/0037000 y 2005/0064514, y las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º US 2006-0134709 A1, presentada el 10 de noviembre de 2005, y US 2006-0177439 A1, presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitadas simultáneamente de los autores de la invención.

Los diacuerpos biespecíficos de la divulgación pueden unirse simultáneamente a dos epítopos separados y distintos. En determinadas realizaciones, los epítopos son del mismo antígeno. En otras realizaciones, los epítopos son de diferentes antígenos. En realizaciones preferidas, al menos un sitio de unión a epítipo se especificó para un determinante expresado en una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, CD3, CD16, CD32, CD64, etc.) que se expresa en linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK) u otros leucocitos monomorfonucleares. En una realización, la molécula de diacuerpo se une al determinante de célula efectora y también activa dicha célula efectora. A este respecto, las moléculas de diacuerpo de la divulgación pueden mostrar funcionalidad de tipo Ig independientemente de si comprenden además un dominio Fc (por ejemplo, ensayado en cualquier ensayo de función efectora conocido en la técnica o ejemplificado en la presente memoria (por ejemplo, ensayo de ADCC). En determinadas realizaciones, el diacuerpo biespecífico de la divulgación se une tanto a un antígeno canceroso en una célula tumoral como a un determinante de célula efectora mientras activa dicha célula. En realizaciones alternativas, el diacuerpo biespecífico o molécula de diacuerpo de la divulgación puede inhibir la activación de una célula diana, por ejemplo, célula efectora, uniéndose simultáneamente a, y, por tanto, conectando, un receptor activador e inhibidor en la misma célula (por ejemplo, unión tanto a CD32A y CD32B, BCR y CD32B o IgE1 y CD32B) como se describe *supra* véase, la sección de Antecedentes). En un aspecto adicional de esta realización, el diacuerpo biespecífico puede mostrar propiedades antivíricas por unión simultánea a dos epítopos neutralizantes en un virus (por ejemplo, epítopos de RSV; epítopos de WNV tales como E16 y E53).

En determinadas realizaciones, las moléculas de diacuerpo biespecífico de la divulgación ofrecen oportunidades únicas para abordar tipos celulares específicos. Por ejemplo, el diacuerpo biespecífico o molécula de diacuerpo puede genomanipularse para que comprenda una combinación de sitios de unión a epítipo que reconozcan un conjunto de antígenos únicos para un tipo célula o tejido diana. Adicionalmente, cuando alguno o ambos antígenos individuales son escasamente comunes por separado en otro tipo de tejido y/o célula, pueden usarse dominios de unión de baja afinidad para construir el diacuerpo o molécula de diacuerpo. Dichos dominios de unión de baja afinidad no podrán unirse al epítipo o antígeno individual con suficiente avidéz con fines terapéuticos. Sin embargo, cuando ambos epítopos o antígenos están presentes en una única célula o tejido diana, la avidéz del diacuerpo o molécula de diacuerpo por la célula o tejido, con respecto a una célula o tejido que expresa únicamente uno de los antígenos, aumentará de modo que dicha célula o tejido pueda abordarse de forma eficaz por la molécula de diacuerpo. Dicha molécula biespecífica puede mostrar unión potenciada a uno o ambos de sus antígenos diana en células que expresan ambos de dichos antígenos con respecto a un diacuerpo monoespecífico o un anticuerpo con una especificidad por únicamente uno de los antígenos.

Preferiblemente, las propiedades de unión de los diacuerpos de la divulgación se caracterizan por ensayos funcionales *in vitro* para determinar la actividad de unión y/o una o más funciones de células efectoras mediadoras de FcγR (mediadas mediante interacciones de Fc-FcγR o mediante la unión inmuno-específica de una molécula de diacuerpo o un FcγR) (véase la sección 5.4.2 y 5.4.3). Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas, por ejemplo, diacuerpos de la divulgación para un FcγR pueden determinarse usando ensayos *in vitro* (ensayos de base bioquímica o inmunológica) conocidos en la técnica para determinar las interacciones de unión de dominio-antígeno o Fc-FcγR, es decir, unión específica de un antígeno a un dominio de unión o unión específica de una región Fc a un FcγR, respectivamente, incluyendo, aunque sin limitación, ensayo de ELISA, ensayo de resonancia de plasmones superficiales, ensayos de inmunoprecipitación (véase la sección 5.4.2. En las realizaciones más preferidas, las

moléculas de la divulgación tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tales como los descritos y divulgados en la presente memoria) como aquellas en ensayos de base *in vitro*. Sin embargo, la presente divulgación no excluye moléculas de la divulgación que no muestren el fenotipo deseado en ensayos de base *in vitro*, pero muestren el fenotipo deseado *in vivo*.

En algunas realizaciones, las moléculas de la divulgación se genomanipulan para que comprendan un patrón de glucosilación alterado o una glucoforma alterada con respecto a la parte comparable de la molécula de molde. Las glucoformas genomanipuladas pueden ser útiles para una diversidad de fines incluyendo, aunque sin limitación, potenciación de la función efectora. Las glucoformas genomanipuladas pueden generarse por cualquier método conocido por un experto en la materia, por ejemplo, usando cepas genomanipuladas o de expresión variante, por coexpresión con una o más enzimas, por ejemplo, DI N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTI11), por expresión de un diacuerpo de la divulgación en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos, o por modificación de uno o más glúcidos después de que el diacuerpo se haya expresado y purificado. Los métodos para generar glucoformas genomanipuladas son conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, los descritos en Umana *et al.* (1999) "Engineered Glycoforms Of An Antineuroblastoma IgG1 With Optimized Antibody-Dependent Cellular Cytotoxic Activity", Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies *et al.* (2001) "Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In Adcc Through Higher Affinity For Fc Gamma RIII," Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields *et al.* (2002) "Lack Of Fucose On Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcgamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity," J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa *et al.* (2003) "The Absence Of Fucose But Not The Presence Of Galactose Or Bisecting N-Acetylglucosamine Of Human IgG1 Complex-Type Oligosaccharides Shows The Critical Role Of Enhancing Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity," J Biol Chem 278:3466-3473; documento US 6602684; documento USSN 10/277370; documento USSN 10/113929; documento PCT WO 00/61739A1; documento PCT WO 01/292246A1; documento PCT WO 02/311140A1; documento PCT WO 02/30954A1; tecnología Potilgent™ (Biowa, Inc. Princeton, NJ); tecnología de genomanipulación de glucosilación GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Suiza. Véase, por ejemplo, la publicación internacional WO 00061739; el documento EA01229125; el documento US 20030115614; Okazaki *et al.* (2004) "Fucose Depletion From Human IgG1 Oligosaccharide Enhances Binding Enthalpy And Association Rate Between IgG1 And FcGammaRIIIA," JMB, 336: 1239-49.

La divulgación abarca además la incorporación de aminoácidos no naturales para generar los diacuerpos de la divulgación. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la materia tales como aquellos que usan la maquinaria biosintética natural para permitir la incorporación de aminoácidos no naturales en proteínas, véase, por ejemplo, Wang *et al.* (2002) "Expanding The Genetic Code," Chem. Comm. 1: 1-11; Wang *et al.* (2001) "Expanding The Genetic Code Of Escherichia coli," Science, 292: 498-500; van Hest *et al.* (2001) "Protein-Based Materials, Toward A New Level Of Structural Control," Chem. Comm. 19: 1897-1904. Estrategias alternativas se centran en las enzimas responsables de la biosíntesis de aminoácil-ARNt, véase, por ejemplo, Tang *et al.* (2001) "Biosynthesis Of A Highly Stable Coiled-Coil Protein Containing Hexafluoroleucine In An Engineered Bacterial Host," J. Am. Chem. Soc. 123(44): 11089-11090; Kiick *et al.* (2001) "Identification Of An Expanded Set Of Translationally Active Methionine Analogues In Escherichia coli," FEBS Lett. 502(1-2):25-30.

En algunas realizaciones, la divulgación abarca métodos de modificación de un dominio VL, VH o Fc de una molécula de la divulgación añadiendo o eliminando un sitio de glucosilación. Los métodos para modificar el glúcido de las proteínas son bien conocidos en la técnica y están abarcados dentro de la divulgación, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6218149; el documento EP 0359096 B1; la publicación de Estados Unidos n.º 2002/0028486; la publicación internacional WO 03/035835; la publicación de Estados Unidos n.º 2003/0115614; la patente de Estados Unidos n.º 6218149; la patente de Estados Unidos n.º 6472511.

Las moléculas de diacuerpo de la presente divulgación pueden construirse para que comprendan un dominio que es un ligando de unión para el receptor del grupo 2D citolítico natural (NKG2D). Dichos ligandos de unión, y particularmente aquellos que no se expresan en células normales, incluyen la molécula de histocompatibilidad 60 (H60), el producto del gen 1 inducible temprano por ácido retinoico (RAE-1) y el transcrito 1 de tipo proteína de unión a UL16 murina (MULT1) (Raulet D.H. (2003) "Roles Of The NKG2D Immunoreceptor And Its Ligands," Nature Rev. Immunol. 3:781-790; Coudert, J.D. *et al.* (2005) "Altered NKG2D Function In NK Cells Induced By Chronic Exposure To Altered NKG2D Ligand-Expressing Tumor Cells," Blood 106:1711-1717). Ligandos adicionales reactivos con NKG2D humano incluyen las moléculas relacionadas con la cadena de MHC de clase I polimórficas MICA y MICB (Diefenbach, A. *et al.* (1999) "Natural Killer Cells: Stress Out, Turn On, Tune In," Curr. Biol. 9(22):R851-R8533; Bauer, S. *et al.* (1999) "Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA," Science 285(5428):727-729; Stephens, H.A. (2001) "MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?," Trends Immunol. 22:378-385.

La secuencia de MICA es la SEQ ID NO: 311:

MGLGPFVFLLL AGIFPFAPPG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLTEVH
 LDGQPFRLCD RQKCRAPQG QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL
 AHIKDQKEGL HSLQEIRVCE IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETKEW
 TMPQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY HAMHADCLQE LRRYLKSGVV
 LRRTVPPMVN VTRSEASEGN ITVTCRASGF YPWNITLSWR QDGVSLSHDT
 QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICQGEEQRF TCYMEHSGNH STHPVPSGKV
 LVLQSHWQTF HVSAAAAAI FVIIIFYVRC CKKKTSAAG PELVSLQVLD
 QHPVGTSDHR DATQLGFQPL MSDLGSTGST EGA

La secuencia de MICB es la SEQ ID NO: 312:

PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE
 DVLGAKTWDI ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGLHSLQ EIRVCEIHED
 SSTRGSRHFY YDGELFLSQN LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM
 KTKTHYRAMQ ADCLOKLQLP PMVNVICSEV SEGNITVTCR ASSFYPRNIT
 LTWRQDGVSL SHNTQQWGDV LPDGNNGTYQT WVATRIRQGE EQRFTCYMEH
 SGNHGHThPVP SGKALVLQSQ RTDFPYVSAA MPCFVIIIL CVPCKKKTS
 AAEGP

- Los anticuerpos que se unen específicamente al receptor de linfocitos T incluyen el anticuerpo anti-TCR BMA 031 (Kurrle, R. *et al.* (1989) "*BMA 031 - A TCR-Specific Monoclonal Antibody For Clinical Application*," Transplant Proc. 21(1 Pt 1):1017-1019; Nashan, B. *et al.* (1987) "Fine Specificity Of A Panel Of Antibodies Against The TCR/CD3 Complex," Transplant Proc. 19(5):4270-4272; Shearman, C.W. *et al.* (1991) "Construction, Expression, And Biologic Activity Of Murine/Human Chimeric Antibodies With Specificity For The Human α/β T Cell," J. Immunol. 146(3):928-935; Shearman, C.W. *et al.* (1991) "*Construction, Expression And Characterization of Humanized Antibodies Directed Against The Human α/β T Cell Receptor*," J. Immunol. 147(12):4366-4373). Los anticuerpos que se unen específicamente al receptor de NKG2D incluyen KYK-2.0 (Kwong, KY *et al.* (2008) "*Generation, Affinity Maturation, And Characterization Of A Human Anti-Human NKG2D Monoclonal Antibody With Dual Antagonistic And Agonistic Activity*," J. Mol. Biol. 384:1143-1156; y PCT/US09/54911).

- A través del uso de dicho diacuerpo, la célula diana ahora se redirige para que sea una célula que pueda unirse por células que presentan el receptor (NKG2D). El receptor de NKG2D se expresa en todos los linfocitos citolíticos naturales humanos (y de otros mamíferos) (Bauer, S. *et al.* (1999) "*Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA*," Science 285(5428):727-729; Jamieson, A.M. *et al.* (2002) "*The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing*," Immunity 17(1):19-29), así como en todos los linfocitos T CD8⁺ (Groh, V. *et al.* (2001) "*Costimulation Of CD8 $\alpha\beta$ T Cells By NKG2D Via Engagement By MIC Induced On Virus-Infected Cells*," Nat. Immunol. 2(3):255-260; Jamieson, A.M. *et al.* (2002) "*The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing*," Immunity 17(1):19-29).

- Como alternativa, las moléculas de diacuerpo de la presente divulgación pueden construirse para que comprendan un dominio que es un ligando de unión para el receptor de linfocitos T ("TCR"). El TCR se expresa de forma nativa por linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, y permite que dichas células reconozcan péptidos antigénicos que se unen y presentan por proteínas de MHC de clase I o clase II de células presentadoras de antígeno. El reconocimiento de un complejo de pMHC (péptido-MHC) por un TCR inicia la propagación de una respuesta inmunitaria celular que da lugar a la producción de citocinas y la lisis de la célula presentadora de antígeno (véase, por ejemplo, Armstrong, K.M. *et al.* (2008) "*Conformational Changes And Flexibility In T-Cell Receptor Recognition Of Peptide-MHC Complexes*," Biochem. J. 415(Pt 2):183-196; Willemsen, R. (2008) "*Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T-Cell Epitopes For Adoptive T-Cell Therapy*," Cytometry A. 73(11):1093-1099; Beier, K.C. *et al.* (2007) "*Master Switches Of T-Cell Activation And Differentiation*," Eur. Respir. J. 29:804-812; Mallone, R. *et al.* (2005) "*Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring And Intervention In Autoimmune Diabetes*," Am. J. Ther. 12(6):534-550).

- Construyendo dichas moléculas de diacuerpo para que comprendan adicionalmente al menos un dominio de unión a epítipo que pueda unirse a, por ejemplo, un receptor presente en la superficie de una célula diana, dichas moléculas de diacuerpo serán moléculas DART y, por tanto, podrán unirse a las células diana y causar de este modo que las células diana presenten el ligando de unión para el receptor del grupo 2D citolítico natural (NKG2D) o al TCR (lo que esté presente en el diacuerpo unido a célula diana) (véase, por ejemplo, Germain, C. *et al.* (2008) "*Redirecting NK Cells Mediated Tumor Cell Lysis By A New Recombinant Bifunctional Protein*," Prot. Engineer. Design Selection 21(11):665-672).

Dichos diacuerpos pueden usarse para redirigir cualquier célula diana deseada a una célula que sea una diana de la lisis celular mediada por linfocitos NK o citotoxicidad mediada por linfocitos T. En una realización, el dominio de

unión a epítipo del diacuerpo que puede unirse a un receptor presente en la superficie de una célula diana es un epítipo que se une a un antígeno asociado a tumor para redirigir dichas células cancerosas a sustratos para la lisis celular mediada por linfocitos NK o citotoxicidad mediada por linfocitos T. Es de particular interés un antígeno asociado a tumor que es un antígeno de cáncer de mama, un antígeno de cáncer de ovario, un antígeno de cáncer de próstata, un antígeno de cáncer cervicouterino, un antígeno de carcinoma pancreático, un antígeno de cáncer pulmonar, un antígeno de cáncer de vejiga, un antígeno de cáncer de colon, un antígeno de cáncer testicular, un antígeno de cáncer de glioblastoma, un antígeno asociado con una neoplasia de linfocitos B, un antígeno asociado con mieloma múltiple, un antígeno asociado con linfoma no hodgkiniano o un antígeno asociado con leucemia linfocítica crónica.

Los antígenos asociados a tumor adecuados para dicho uso incluyen A33 (un antígeno de carcinoma colorrectal; Almqvist, Y. 2006, *Nucl Med Biol.* Nov;33(8):991-998); B1 (Egloff, A.M. *et al.* 2006, *Cancer Res.* 66(1):6-9); BAGE (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84); beta-catenina (Prange W. *et al.* 2003 *J Pathol.* 201(2):250-9); CA125 (Bast, R.C. Jr. *et al.* 2005 *Int J Gynecol Cancer* 15 Supl. 3:274-81); CD5 (Calin, G.A. *et al.* 2006 *Semin Oncol.* 33(2):167-73); CD19 (Troussard, X. *et al.* 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48); CD20 (Thomas, D.A. *et al.* 2006 *Hematol Oncol Clin North Am.* 20(5):1125-36); CD22 (Kreitman, R.J. 2006 *AAPS J.* 18;8(3):E532-51); CD23 (Rosati, S. *et al.* 2005 *Curr Top Microbiol Immunol.* 5; 294:91-107); CD25 (Troussard, X. *et al.* 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48); CD27 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); CD28 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); CD36 (Ge, Y. 2005 *Lab Hematol.* 11(1):31-7); CD40/CD154 (Messmer, D. *et al.* 2005 *Ann N Y Acad Sci.* 1062:51-60); CD45 (Jurcic, J.G. 2005 *Curr Oncol Rep.* 7(5):339-46); CD56 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); CD79a/CD79b (Troussard, X. *et al.* 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48); Chu, P.G. *et al.* 2001 *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 9(2):97-106); CD103 (Troussard, X. *et al.* 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48); CDK4 (Lee, Y.M. *et al.* 2006 *Cell Cycle* 5(18):2110-4); CEA (antígeno carcinoembrionario; Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8):638-46); Tellez-Avila, F.I. *et al.* 2005 *Rev Invest Clin.* 57(6):814-9); CTLA4 (Peggs, K.S. *et al.* 2006 *Curr Opin Immunol.* 18(2):206-13); EGF-R (receptor del factor de crecimiento epidérmico; Adenis, A. *et al.* 2003 *Bull Cancer.* 90 n.º especial: S228-32); Erb (ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. *et al.* 2002 *Oncogene* 21(57):8732-40); Rimon, E. *et al.* 2004 *Int J Oncol.* 24(5):1325-38); GAGE (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. *et al.* 2006 *Int J Cancer.* 118(1):123-8); GD2/GD3/GM2 (Livingston, P.O. *et al.* 2005 *Cancer Immunol Immunother.* 54(10):1018-25); gp100 (Lotem, M. *et al.* 2006 *J Immunother.* 29(6):616-27); HER-2/neu (Kumar, Pal S *et al.* 2006 *Semin Oncol.* 33(4):386-91); E6 de papilomavirus humano/E7 de papilomavirus humano (DiMaio, D. *et al.* 2006 *Adv Virus Res.* 66:125-59); KSA (17-1A) (Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-80); MAGE (MAGE-1; MAGE-3; (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84); MART (Kounalakis, N. *et al.* 2005 *Curr Oncol Rep.* 7(5):377-82); MUC-1 (Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8):638-46); MUM-1 (Castelli, C. *et al.* 2000 *J Cell Physiol.* 182(3):323-31); N-acetilglucosaminiltransferasa (Dennis, J.W. 1999 *Biochim Biophys Acta.* 6;1473(1):21-34); p15 (Gil, J. *et al.* 2006 *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(9):667-77); PSA (antígeno específico de próstata; Cracco, C.M. *et al.* 2005 *Minerva Urol Nefrol.* 57(4):301-11); PSMA (Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-80); sTn (Holmberg, L.A. 2001 *Expert Opin Biol Ther.* 1(5):881-91); receptor de TNF (receptor de TNF- α , receptor de TNF- β ; o receptor de TNF- γ ; van Horssen, R. *et al.* 2006 *Oncologist.* 11(4):397-408; Gardnerova, M. *et al.* 2000 *Curr Drug Targets.* 1(4):327-64; o receptor de VEGF (O'Dwyer, P.J. 2006 *Oncologist.* 11(9):992-8).

Antígenos asociados a tumor adicionales para dicho uso (y publicaciones que divulgan anticuerpos específicamente reactivos para dichos antígenos) incluyen ADAM-9 (publicación de patente de Estados Unidos n.º 2006/0172350; publicación PCT n.º WO 06/084075); ALCAM (publicación PCT n.º WO 03/093443); carboxipeptidasa M (publicación de patente de Estados Unidos n.º 2006/0166291); CD46 (patente de Estados Unidos n.º 7148038; publicación PCT n.º WO 03/032814); citoqueratina 8 (publicación PCT n.º WO 03/024191); receptores de efrina (y en particular EphA2 (patente de Estados Unidos n.º 7569672; publicación PCT n.º WO 06/084226); integrina alfa-V-beta-6 (publicación PCT n.º WO 03/087340); JAM-3 (publicación PCT n.º WO 06/084078); KID3 (publicación PCT n.º WO 05/028498); KID31 (publicación PCT n.º WO 06/076584); LUCA-2 (publicación de patente de Estados Unidos n.º 2006/0172349; publicación PCT n.º WO 06/083852); oncostatina M (receptor beta de oncostatina) (patente de Estados Unidos n.º 7572896; publicación PCT n.º WO 06/084092); PIPA (patente de Estados Unidos n.º 7405061; publicación PCT n.º WO 04/043239); RAAG10 (patente de Estados Unidos n.º 7527969; publicación PCT n.º WO 04/001381); ROR1 (patente de Estados Unidos n.º 5843749); TES7 (publicación PCT n.º WO 08/066691); y el receptor de transferrina (patente de Estados Unidos n.º 7572895; publicación PCT n.º WO 05/121179).

También son de interés antígenos específicos para agentes infecciosos particulares, por ejemplo, agentes víricos que incluyen, aunque sin limitación, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), gripe, virus del papiloma humano (VPH), virus de la glosopeda (coxackievirus), el virus de la rabia, virus del herpes simple (VHS) y los agentes causantes de la gastroenteritis, incluyendo rotavirus, adenovirus, calicivirus, astrovirus y virus Norwalk; agentes bacterianos incluyendo, aunque sin limitación, *E. coli* *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Hemophilus influenzae*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Streptococcus pneumoniae*, agentes fúngicos y parásitos tales como Giardia.

Como alternativa dicho epítipo puede unirse a un receptor de Fc (por ejemplo, Fc γ RI o Fc γ RII), para, por ejemplo, redirigir las células de leucemia monocítica aguda a sustratos para la lisis celular mediada por linfocitos NK.

5.1 Dominios de unión de diacuerpo

Los diacuerpos de la presente divulgación comprenden dominios de unión a antígeno en general derivados de inmunoglobulinas o anticuerpos. Los anticuerpos de los que derivan los dominios de unión usados en los métodos de la presente memoria pueden ser de cualquier origen animal, incluyendo aves y mamíferos (por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, murinos, de burro, de oveja, de conejo, de cabra, de cobaya, de camello, de caballo o de pollo). Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Tal como se usa en la presente memoria, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de colecciones de inmunoglobulina humana o colecciones de secuencias codificantes de inmunoglobulina humana sintéticas o de ratones que expresan anticuerpos a partir de genes humanos.

La descripción contempla el uso de cualquier anticuerpo conocido en la técnica para el tratamiento y/o prevención del cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria o enfermedad infecciosa como fuente de dominios de unión para los diacuerpos de la divulgación. Se proporcionan ejemplos no limitantes de anticuerpos conocidos contra el cáncer en la sección 5.7.1, así como otros anticuerpos específicos para los antígenos diana enumerados y anticuerpos contra los antígenos del cáncer enumerados en la sección 5.6.1; se proporcionan ejemplos no limitantes de anticuerpos conocidos para el tratamiento y/o prevención de enfermedad autoinmunitaria y enfermedad inflamatoria en la sección 5.7.2, así como anticuerpos contra los antígenos diana enumerados y anticuerpos contra los antígenos enumerados en la sección 5.6.2; en otras realizaciones, pueden usarse anticuerpos contra epítopos asociados con enfermedades infecciosas como se enumera en la sección 5.6.3. En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden una región Fc variante que comprende una o más modificaciones de aminoácido, que se han identificado por tener una función efectora conferida y/o afinidad potenciada por FcγRIIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. Un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o prevención de trastornos inflamatorios que pueden genomanipularse de acuerdo con la divulgación se presenta en la tabla 9, y un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o prevención de trastorno autoinmunitario se presenta en la tabla 10.

Para algunos usos, incluyendo uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar diacuerpos con dominios variables derivados de anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados. Los dominios variables de anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando colecciones de anticuerpos derivadas de secuencia de inmunoglobulina humana. Véanse también las patentes de Estados Unidos n.º 4444887 y 4716111 y las publicaciones internacionales n.º WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo, una variante o un fragmento del mismo que puede unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región estructural que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos dominios variables en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana.

Las regiones estructurales y CDR de un anticuerpo humanizado no tienen que corresponder de forma precisa a las secuencias precursoras, por ejemplo, la CDR donadora o la región estructural de consenso pueden mutagenizarse por sustitución, inserción o eliminación de al menos un resto de modo que el resto de CDR o estructural en ese sitio no corresponda al de consenso o el anticuerpo donador. Dichas mutaciones, sin embargo, son preferiblemente no extensivas. Habitualmente, al menos un 75 % de los restos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias de la región estructural (FR) y CDR precursoras, más a menudo un 90 % y muchos más preferiblemente más de un 95 %. Los anticuerpos humanizados pueden producirse usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, injerto de CDR (patente europea EP 239400; publicación internacional n.º WO 91/09967; y patentes de Estados Unidos n.º 5225539, 5530101, y 5585089), rechapado o repavimentación (patentes europeas n.º EP 592106 y EP 519596; Padlan (1991) "A Possible Procedure For Reducing The Immunogenicity Of Antibody Variable Domains While Preserving Their Ligand-Binding Properties," *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) "Human-Engineered Monoclonal Antibodies Retain Full Specific Binding Activity By Preserving Non-CDR Complementarity-Modulating Residues," *Protein Engineering* 7(6):805-814; y Roguska et al. (1994) "Humanization Of Murine Monoclonal Antibodies Through Variable Domain Resurfacing," *Proc Natl Acad Sci USA* 91:969-973), reorganización de cadenas (patente de Estados Unidos n.º 5565332) y técnicas divulgadas en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6407213, 5766886, 5585089, la publicación internacional n.º WO 9317105, Tan et al. (2002) "'Superhumanized' Antibodies: Reduction Of Immunogenic Potential By Complementarity-Determining Region Grafting With Human Germline Sequences: Application To An Anti-CD28," *J. Immunol.* 169:1119-25, Caldas et al. (2000) "Design And Synthesis Of Germline-Based Hemi-Humanized Single-Chain Fv Against The CD18 Surface Antigen," *Protein Eng.* 13:353-60, Morea et al. (2000) "Antibody Modeling: Implications For Engineering And Design," *Methods* 20:267-79, Baca et al. (1997) "Antibody Humanization Using

Monovalent Phage Display," J. Biol. Chem. 272:10678-84, Roguska *et al.* (1996) "A Comparison Of Two Murine Monoclonal Antibodies Humanized By CDR-Grafting And Variable Domain Resurfacing," Protein Eng. 9:895-904, Couto *et al.* (1995) "Designing Human Consensus Antibodies With Minimal Positional Templates," Cancer Res. 55 (23 Sup.):5973s-5977s, Couto *et al.* (1995) "Anti-BA46 Monoclonal Antibody Mc3: Humanization Using A Novel Positional Consensus And In Vivo And In Vitro Characterization," Cancer Res. 55:1717-22, Sandhu (1994) "A Rapid Procedure For The Humanization Of Monoclonal Antibodies," Gene 150:409-10, Pedersen *et al.* (1994) "Comparison Of Surface Accessible Residues In Human And Murine Immunoglobulin Fv Domains. Implication For Humanization Of Murine Antibodies," J. Mol. Biol. 235:959-973, Jones *et al.* (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse," Nature 321:522-525, Riechmann *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy," Nature 332:323-327 y Presta (1992) "Antibody Engineering," Curr. Op. Biotech. 3(4):394-398. A menudo, los restos estructurales en las regiones estructurales se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de los restos CDR y estructurales para identificar restos estructurales importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar restos estructurales infrecuentes en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen *et al.* patente de Estados Unidos n.º 5585089; publicaciones de Estados Unidos n.º 2004/0049014 y 2003/0229208; patentes de Estados Unidos n.º 6350861; 6180370; 5693762; 5693761; 5585089; y 5530101 y Riechmann *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy," Nature 332:323-327.).

En una realización mucho más preferida, el dominio de unión humanizado se une específicamente al mismo epítipo que el anticuerpo murino donador. Un experto en la materia apreciará que la divulgación abarca injerto de CDR de anticuerpos en general. Por tanto, los anticuerpos donador y aceptador pueden obtenerse de animales de la misma especie e incluso la misma clase o subclase de anticuerpo. Más habitualmente, sin embargo, los anticuerpo donador y aceptador se obtienen de animales de diferentes especies. Típicamente, el anticuerpo donador es un anticuerpo no humano, tal como un mAb de roedor y el anticuerpo aceptador es un anticuerpo humano.

En algunas realizaciones, al menos una CDR del anticuerpo donador se injerta en el anticuerpo humano. En otras realizaciones, al menos dos y preferiblemente las tres CDR de cada una de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera se injertan en el anticuerpo humano. Las CDR pueden comprender las CDR de Kabat, las CDR del bucle estructural o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la divulgación abarca un anticuerpo contra FcγRIIB humanizado que comprende al menos una cadena pesada con CDR injertada y al menos una cadena ligera con CDR injertada.

Los diacuerpos usados en los métodos incluyen derivados que están modificados, es decir, por la adhesión covalente de cualquier tipo de molécula al diacuerpo. Por ejemplo, aunque sin limitación, los derivados de diacuerpo incluyen diacuerpos que se han modificado, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Puede realizarse cualquiera de numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas, incluyendo, aunque sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en que se obtienen diferentes partes del anticuerpo de diferentes moléculas de inmunoglobulina tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo no humano y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison (1985) "Transfectomas Provide Novel Chimeric Antibodies," Science 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) "Chimeric Antibodies," BioTechniques 4:214-221; Gillies *et al.* (1989) "High-Level Expression Of Chimeric Antibodies Using Adapted cDNA Variable Region Cassettes," J. Immunol. Methods 125:191-202; y las patentes de Estados Unidos n.º 6311415, 5807715, 4816567 y 4816397.

A menudo, los restos estructurales en las regiones estructurales se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de los restos CDR y estructurales para identificar restos estructurales importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar restos estructurales infrecuentes en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5585089 y Riechmann *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy," Nature 332:323-327)

Los anticuerpos monoclonales a partir de los que pueden prepararse los dominios de unión de los diacuerpos de la divulgación usando una amplia diversidad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinante y de presentación en fagos, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma incluyendo las conocidas en la técnica y mostradas, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.ª ed. 1988); Hammerling, *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, pág. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en la presente memoria, no está limitada a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un

anticuerpo que se obtiene de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o fágico, y no al método por el que se produce.

Los métodos para producir y cribar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridomas son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitante, pueden inmunizarse ratones con un antígeno de interés o una célula que expresa dicho antígeno. Una vez se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos en el suero de ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos entonces se fusionan por técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada. Se seleccionan hibridomas y se clonan por dilución limitante. Los clones de hibridoma entonces se ensayan por métodos conocidos en la técnica para células que secreten anticuerpos que puedan unirse al antígeno. El líquido ascítico, que en general contiene niveles altos de anticuerpos, puede generarse inoculando ratones por vía intraperitoneal con clones de hibridoma positivos. Los antígenos de interés incluyen, aunque sin limitación, antígenos asociados con los cánceres proporcionados en la sección 5.8.1, antígenos asociados con las enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias proporcionadas en la sección 5.8.2, antígenos asociados con las enfermedades infecciosas proporcionadas en la sección 5.8.3 y las toxinas proporcionadas en la sección 5.8.4.

Los anticuerpos también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpo funcionales en la superficie de partículas fágicas que portan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. En una realización particular, dicho fago puede utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno, tales como Fab y Fv o Fv estabilizados por enlace disulfuro, expresados a partir de un repertorio o colección de combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés puede seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o microesfera. El fago usado en estos métodos es típicamente un fago filamentoso, incluyendo fd y M13. Los dominios de unión a antígeno se expresan como una proteína fusionada de forma recombinante a la proteína del fago del gen III o gen VIII. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para preparar las inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, de la presente divulgación incluyen los divulgados en Brinkmann *et al.* (1995) "*Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragments*," J. Immunol. Methods, 182:41-50; Ames *et al.* (1995) "*Conversion Of Murine Fabs Isolated From A Combinatorial Phage Display Library To Full Length Immunoglobulins*," J. Immunol. Methods, 184:177-186; Kettleborough *et al.* (1994) "*Isolation Of Tumor Cell-Specific Single-Chain Fv From Immunized Mice Using Phage-Antibody Libraries And The Re-Construction Of Whole Antibodies From These Antibody Fragments*," Eur. J. Immunol., 24:952-958; Persic *et al.* (1997) "*An Integrated Vector System For The Eukaryotic Expression Of Antibodies Or Their Fragments After Selection From Phage Display Libraries*," Gene, 187:9-18; Burton *et al.* (1994) "*Human Antibodies From Combinatorial Libraries*," Advances in Immunology, 57:191-280; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y patentes de Estados Unidos n.º 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 y 5969108.

La tecnología de presentación en fagos puede usarse para aumentar la afinidad de un anticuerpo por su antígeno. Esta técnica sería útil para obtener anticuerpos de alta afinidad. La tecnología, mencionada como maduración de afinidad, emplea mutagénesis o paseo de CDR y reelección usando el antígeno afín para identificar anticuerpos que se unan con mayor afinidad al antígeno en comparación con el anticuerpo inicial o precursor (véase, por ejemplo, Glaser *et al.* (1992) "*Dissection Of The Combining Site In A Humanized Anti-Tac Antibody*," J. Immunology 149:2607-2614). Mutagenizar codones completos en lugar de nucleótidos individuales produce un repertorio semialeatorizado de mutaciones de aminoácido. Pueden construirse colecciones que consisten en una combinación de clones variantes cada uno de los cuales difiere en una alteración de un aminoácido en una única CDR y que contiene variantes que representan cada sustitución posible de aminoácido para cada resto CDR. Los mutantes con afinidad de unión aumentada por el antígeno pueden cribarse poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Puede usarse cualquier método de cribado conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con avidez aumentada por el antígeno (por ejemplo, ELISA) (véase, Wu *et al.* (1998) "*Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized mAb*," Proc Natl. Acad Sci. USA 95:6037-6042; Yelton *et al.* (1995) "*Affinity Maturation Of The Br96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis*," J. Immunology 155:1994-2004). El paseo de CDR que aleatoriza la cadena ligera también es posible (véase, Schier *et al.* (1996) "*Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site*," J. Mol. Bio. 263:551-567).

La presente divulgación también abarca el uso de dominios de unión que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios de unión descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácido) en las regiones estructurales o CDR. Preferiblemente, las mutaciones en estos dominios de unión mantienen o potencian la avidez y/o afinidad de los dominios de unión por FcγRIIB al que se unen inmuno-específicamente. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia (por ejemplo, inmunoensayos) para ensayar la afinidad de un anticuerpo por un antígeno particular.

Pueden usarse técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis

dirigida al sitio y mutagénesis mediado por PCR, que provoca sustituciones de aminoácido. Preferiblemente, los derivados incluyen menos de 15 sustituciones de aminoácido, menos de 10 sustituciones de aminoácido, menos de 5 sustituciones de aminoácido, menos de 4 sustituciones de aminoácido, menos de 3 sustituciones de aminoácido o menos de 2 sustituciones de aminoácido con respecto al anticuerpo original o fragmento del mismo. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones conservativas de aminoácido generadas en uno o más restos de aminoácido no esenciales predichos.

5.1.1 Diacuerpos que comprenden sitios de unión a epítipo que se unen inmunoespecíficamente a FcγRIIB

En una realización particular, al menos uno de los dominios de unión de los diacuerpos de la divulgación agoniza al menos una actividad de FcγRIIB. En una realización de la molécula de diacuerpo, dicha actividad es inhibición de la señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En otra realización, el dominio de unión inhibe la activación de linfocitos B, la proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos, el flujo entrante de calcio intracelular de linfocitos B, la progresión del ciclo celular o la actividad de una o más moléculas de señalización posteriores en la ruta de transducción de señales de FcγRIIB. En otra realización más, el dominio de unión potencia la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En una realización adicional de la molécula de diacuerpo, el dominio de unión inhibe la actividad de MAP cinasa o el reclutamiento de Akt en la ruta de señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En otra realización, el dominio de unión agoniza la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI. En una realización particular, dicho dominio de unión inhibe la activación de mastocitos inducida por FcεRI, la movilización de calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina. En otra realización, los dominios de unión de la molécula de diacuerpo estimulan la fosforilación de FcγRIIB, estimulan el reclutamiento de SHIP, estimulan la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, o inhiben la activación de miembros de la familia de MAP cinasa (por ejemplo, Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En otra realización más, los dominios de unión de la molécula de diacuerpo potencian la fosforilación de tirosina de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra realización, los dominios de unión de la molécula de diacuerpo inhiben la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos.

En otra realización, los dominios de unión antagonizan al menos una actividad de FcγRIIB. En una realización, dicha actividad es activación de la señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En una realización particular, los dominios de unión potencian la activación de linfocitos B, la proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos, el flujo entrante de calcio intracelular o la actividad de una o más moléculas de señalización posteriores en la ruta de transducción de señales de FcγRIIB. En otra realización particular más, los dominios de unión disminuyen la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En una realización adicional de la molécula de diacuerpo, los dominios de unión potencian la actividad de MAP cinasa o el reclutamiento de Akt en la ruta de señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En otra realización, los dominios de unión antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI. En una realización particular, los dominios de unión potencian la activación de mastocitos inducida por FcεRI, la movilización de calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina. En otra realización, los dominios de unión inhiben la fosforilación de FcγRIIB, inhiben el reclutamiento de SHIP, inhiben la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, potencian la activación de miembros de la familia de MAP cinasa (por ejemplo, Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En otra realización más, los dominios de unión inhiben la fosforilación de tirosina de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra realización, los dominios de unión potencian la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos. En otra realización, los dominios de unión evitan la fagocitosis, la eliminación de partículas opsonizadas por macrófagos esplénicos.

En otras realizaciones, al menos uno de los dominios de unión puede usarse para dirigir los anticuerpos de la divulgación a células que expresan FcγRIIB.

En una realización particular, uno de los dominios de unión se obtiene de un anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6 o 3H7, que tienen los números de acceso a la ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. Se han depositado hibridomas que producen los anticuerpos 2B6 y 3H7 en la American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 13 de agosto de 2002 según las provisiones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimientos de Patente, y se les ha asignado los números de acceso PTA-4591 (para el hibridoma que produce 2B6) y PTA-4592 (para el hibridoma que produce 3H7), respectivamente. En una realización preferida, los dominios de unión son humanos o se han humanizado, preferiblemente se obtienen de una versión humanizada del anticuerpo producido por el clon 3H7 o 2B6.

La divulgación también abarca diacuerpos con dominios de unión de otros anticuerpos, que se unen específicamente a FcγRIIB, preferiblemente a FcγRIIB humano, más preferiblemente a FcγRIIB humano nativo, que se obtienen de clones que incluyen, aunque sin limitación, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 y 1F2 que tienen los números de acceso a la ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente. Los hibridomas que producen los clones identificados anteriormente se depositaron según las provisiones del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 7 de mayo de 2004. En realizaciones preferidas, los dominios de unión de los anticuerpos descritos anteriormente están humanizados.

En una realización específica, los dominios de unión usados en los diacuerpos de la presente divulgación son de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferiblemente las 6 CDR) del anticuerpo producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. En otra realización, el dominio de unión se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir del clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, respectivamente y/o compete con el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir del clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, como se determina, por ejemplo, en un ensayo de ELISA u otro inmunoensayo competitivo apropiado, y también se une a FcγRIIB con una afinidad mayor que la del dominio que se une a FcγRIIA.

La presente divulgación también abarca diacuerpos con dominios de unión que comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable y/o cadena ligera variable que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable y/o cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. La presente divulgación abarca además diacuerpos con dominios de unión que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que la de dicho anticuerpo o fragmento del mismo que se une a FcγRIIA, y que comprende una secuencia de aminoácidos de una o más CDR que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por cualquier método conocido para los expertos en la materia, incluyendo búsquedas de proteínas en BLAST.

La presente divulgación también abarca el uso de diacuerpos que contienen dominios de unión que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que la del dominio de unión que se une a FcγRIIA, que están codificados por una secuencia de nucleótidos que hibrida con la secuencia de nucleótidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 en condiciones rigurosas. En una realización preferida, el dominio de unión se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que la de FcγRIIA, y comprende una cadena ligera variable y/o cadena pesada variable codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable y/o cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 en condiciones rigurosas. En otra realización preferida, los dominios de unión se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que a FcγRIIA, y comprenden una o más CDR codificadas por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, aunque sin limitación, hibridación de ADN unido a filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6X a aproximadamente 45 °C seguida de uno o más lavados en SSC 0,2X/SDS al 0,1 % a aproximadamente 50-65 °C, condiciones altamente rigurosas tales como hibridación con ADN unido a filtro en SSC 6X a aproximadamente 45 °C seguida de uno o más lavados en SSC 0,1X/SDS al 0,2% a aproximadamente 60 °C, u otras cualesquiera condiciones de hibridación rigurosa conocidas para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. *et al.*, ed. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley and Sons, Inc., NY en las páginas 6.3.1 a 6.3.6 y 2.10.3).

La presente divulgación también abarca el uso de dominios de unión que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios de unión descritos anteriormente con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácido) en las regiones estructural o CDR. Preferiblemente, las mutaciones en estos dominios de unión mantienen o potencian la avidez y/o afinidad de los dominios de unión por FcγRIIB al que se unen inmuno-específicamente. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia (por ejemplo, inmunoensayos) para ensayar la afinidad de un anticuerpo por un antígeno particular.

Pueden usarse técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediado por PCR, que provoca sustituciones de aminoácido. Preferiblemente, los derivados incluyen menos de 15 sustituciones de aminoácido, menos de 10 sustituciones de aminoácido, menos de 5 sustituciones de aminoácido, menos de 4 sustituciones de aminoácido, menos de 3 sustituciones de aminoácido o menos de 2 sustituciones de aminoácido con respecto al anticuerpo original o fragmento del mismo. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones conservativas de aminoácido generadas en uno o más restos de aminoácido no esenciales predichos.

En realizaciones preferidas, los dominios de unión se obtienen de anticuerpos humanizados. Un anticuerpo específico para FcγRIIB humanizado puede comprender sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana.

Los diacuerpos de la presente divulgación comprenden dominios variable humanizados específicos para FcγRIIB en que una o más regiones de una o más CDR de las regiones variables de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo humano (el anticuerpo destinatario) se han sustituido por partes análogas de una o más CDR de un anticuerpo monoclonal donador que se une específicamente a FcγRIIB, con una mayor afinidad que a FcγRIIA, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados se unen al mismo epítipo que 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, respectivamente.

En una realización preferida, las regiones CDR del dominio de unión a FcγRIIB humanizado se obtienen de un anticuerpo murino específico para FcγRIIB. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados descritos en la presente memoria comprenden alteraciones, incluyendo, aunque sin limitación, eliminaciones, inserciones, modificaciones de aminoácido del anticuerpo aceptador, es decir, regiones estructurales del dominio variable de cadena pesada y/o cadena ligera humana que son necesarias para retener la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal donador. En algunas realizaciones, las regiones estructurales de los anticuerpos humanizados descritos en la presente memoria no consisten esencialmente en la secuencia de aminoácidos precisa de la región estructural de una región variable de anticuerpo humano de origen natural, sino que contienen diversas alteraciones incluyendo, aunque sin limitación, eliminaciones, inserciones, modificaciones de aminoácido que alteran la propiedad del anticuerpo humanizado, por ejemplo, mejoran las propiedades de unión de una región de anticuerpo humanizado que es específica para la misma diana que el anticuerpo específico para FcγRIIB murino. En las realizaciones más preferidas, se genera una cantidad mínima de alteraciones en la región estructural para evitar introducciones a gran escala de restos estructurales no humanos y para asegurar inmunogenicidad mínima del anticuerpo humanizado en seres humanos. El anticuerpo monoclonal donador es preferiblemente un anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2.

En una realización específica, el dominio de unión abarca dominios variables de un anticuerpo con CDR injertada que se une específicamente a FcγRIIB con una afinidad mayor que la de dicho anticuerpo cuando se une a FcγRIIA, en el que el anticuerpo con CDR injertada comprende un dominio de región variable de cadena pesada que comprende restos estructurales del anticuerpo destinatario y restos del anticuerpo monoclonal donador, que se une específica a FcγRIIB con una afinidad mayor que la de dicho anticuerpo cuando se une a FcγRIIA, por ejemplo, anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. En otras realización específica, los diacuerpos de la divulgación comprenden dominios variables de un anticuerpo con CDR injertada que se une específicamente a FcγRIIB con una afinidad mayor que la de dicho anticuerpo cuando se une a FcγRIIA, en el que el anticuerpo con CDR injertada comprende un dominio de región variable de cadena ligera que comprende restos estructurales del anticuerpo destinatario y restos del anticuerpo monoclonal donador, que se une específica a FcγRIIB con una afinidad mayor que la de dicho anticuerpo cuando se une a FcγRIIA, por ejemplo, anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2.

Los dominios variables anti-FcγRIIB humanizados usados en la divulgación pueden tener una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25) y/o CDR2 (SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27) y/o CDR3 (SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29) y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31) y/o CDR2 (SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 35) y/o CDR3 (SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37).

En una realización específica, el diacuerpo comprende dominios variables de un anticuerpo 2B6 humanizado, en el que la región VH consiste en los segmentos FR del segmento VH de la línea germinal humana VH1-18 (Matsuda *et al.* (1998) "*The Complete Nucleotide Sequence Of The Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus*," J. Exp. Med. 188:2151-2162) y JH6 (Ravetch *et al.* (1981) "*Structure Of The Human Immunoglobulin Mu Locus: Characterization Of Embryonic And Rearranged J And D Genes*," Cell 27(3 Pt. 2): 583-91), y una o más regiones CDR del VH de 2B6, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, o SEQ ID NO: 28. En una realización, el VH de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38. En otra realización, el dominio VH de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de Hu2B6VH, SEQ ID NO: 85, y puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 86. En otra realización específica, el diacuerpo comprende además una región VL, que consiste en los segmentos FR del segmento VL de la línea germinal humana VK-A26 (Lautner-Rieske *et al.* (1992) "*The Human Immunoglobulin Kappa Locus. Characterization Of The Duplicated A Regions*," Eur. J. Immunol. 22:1023-1029) y JK4 (Hieter *et al.* (1982) "*Evolution Of Human Immunoglobulin Kappa J Region Genes*," J. Biol. Chem. 257:1516-22), y una o más regiones CDR de 2B6VL, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, y SEQ ID NO: 36. En una realización, el VL de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40, o SEQ ID NO: 41. En una realización específica, el VL de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de Hu2B6VL, SEQ ID NO: 87, y puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos proporcionada en la SEQ ID NO: 88.

En otra realización específica, el diacuerpo tiene dominios variables de un anticuerpo 3H7 humanizado, en el que la región VH consiste en los fragmentos FR de un segmento VH de la línea germinal humana y las regiones CDR del VH de 3H7, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35. En otra realización específica, el anticuerpo 3H7 humanizado comprende además una región VL, que consiste en los segmentos FR de un segmento

VL de la línea germinal humana y las regiones CDR de 3H7VL, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42.

En particular, los dominios de unión se unen inmunoespecíficamente a dominios extracelulares de FcγRIIB humano nativo, y comprenden (o como alternativa consisten en) secuencias de CDR de 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, en cualquiera de las siguientes combinaciones: una CDR1 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH y una CDR1 de VL; una CDR2 de VH y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR3 de VH y una CDR1 de VL; una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR3 de VH y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH1, una CDR2 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR1 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VL, una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL; o cualquier combinación de las mismas de las CDR de VH y las CDR VL divulgadas en la presente memoria.

Los anticuerpos para obtener dominios de unión a incluir en los diacuerpos de la divulgación pueden caracterizarse además por cartografiado de epítomos, de modo que pueden seleccionarse anticuerpos que tienen la máxima especificidad por FcγRIIB en comparación con FcγRIIA. Los métodos de cartografiado de epítomos de los anticuerpos son bien conocidos en la técnica y están incluidos dentro de los métodos de la divulgación. En determinadas realizaciones, pueden usarse proteínas de fusión que comprenden una o más regiones de FcγRIIB en el cartografiado de los epítomos de un anticuerpo de la divulgación. En una realización específica, la proteína difusión contiene la secuencia de aminoácidos de una región de un FcγRIIB fusionado a la parte Fc de IgG2 humana. Cada proteína de fusión puede comprender además sustituciones y/o remplazos de aminoácido de determinadas regiones del receptor con la región correspondiente de un receptor homólogo, por ejemplo, FcγRIIA, como se muestra en la tabla 2 a continuación. pMGX125 y pMGX132 contienen el sitio de unión de IgG del receptor FcγRIIB, el primero con el extremo C de FcγRIIB y el último con el extremo C de FcγRIIA y pueden usarse para diferenciar la unión del extremo C. Los otros tienen sustituciones de FcγRIIA en el sitio de unión de IgG y el extremo N de FcγIIA o FcγIIB. Estas moléculas pueden ayudar a determinar la parte de la molécula receptora donde se unen los anticuerpos.

Tabla 2. Lista de proteínas de fusión que pueden usarse para investigar el epítipo de los anticuerpos monoclonales anti-FcγRIIB. Los restos 172 a 180 pertenecen al sitio de unión a IgG de FcγRIIA y B. Los aminoácidos específicos de la secuencia de FcγRIIA están en negrita.

Plásmido	Receptor	Extremo N	172-180	SEQ ID NO:	Extremo C
pMGX125	RIIb	Iib	KKFSRSDPN	43	APS-----SS (Iib)
pMGX126	RIIa/b	Ila	Q KFSRLDPN	44	APS-----SS (Iib)
pMGX127		Ila	Q KFSRLDPT	45	APS-----SS (Iib)
pMGX128		Iib	KKFSRLDPT	46	APS-----SS (Iib)
pMGX129		Ila	Q KFSHLDPT	47	APS-----SS (Iib)
pMGX130		Iib	KKFSHLDPT	48	APS-----SS (Iib)
pMGX131		Ila	Q KFSRLDPN	49	VPSMGSSS(Ila)
pMGX132		Iib	KKFSRSDPN	50	VPSMGSSS(Ila)
pMGX133	RIIa-131R	Ila	Q KFSRLDPT	51	VPSMGSSS(Ila)

pMGX134	RIIa-131H	Ila	QKFSHLDPT	52	VPSMGSSS(Ila)
pMGX135		Ilb	KKFSRLDPT	53	VPSMGSSS(Ila)
pMGX136		Ilb	KKFSHLDPT	54	VPSMGSSS(Ila)
Nota: APSSS es la SEQ ID NO: 309; VPSMGSSS es la SEQ ID NO: 310					

Las proteínas de fusión pueden usarse en cualquier ensayo bioquímico para la determinación de la unión a un anticuerpo anti-FcγRIIB de la divulgación, por ejemplo, un ELISA. En otras realizaciones, puede hacerse confirmación adicional de la especificidad de epítipo usando péptidos con restos específicos remplazados con aquellos de la secuencia de FcγRIIA.

Los anticuerpos pueden caracterizarse usando ensayos para identificar la función de los anticuerpos de la divulgación, particularmente la actividad de modular la señalización de FcγRIIB. Por ejemplo, los ensayos de caracterización pueden medir la fosforilación de restos de tirosina en el motivo ITIM de FcγRIIB, o medir la inhibición de la movilización de calcio generada por el receptor de linfocitos B. Los ensayos de caracterización pueden estar basados en células o pueden ser ensayos sin células.

Ha quedado bien establecido en la técnica que en mastocitos la coagregación de FcγRIIB con el receptor de IgE de alta afinidad, FcεRI, da lugar a la inhibición de la desgranulación inducida por antígeno, la movilización de calcio y la producción de citocinas (Metcalf D.D. *et al.* (1997) "*Mast Cells*," *Physiol. Rev.* 77:1033-1079; Long E.O. (1999) "*Regulation Of Immune Responses Through Inhibitory Receptors*," *Annu. Rev. Immunol.* 17: 875-904). Los detalles moleculares de esta ruta de señalización se han dilucidado recientemente (Ott V. L. (2002) "*Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of FcγRIIB Inhibition Of Fc Epsilon RI Signaling*," *J. Immunol.* 162(9):4430-4439). Una vez coagregado con FcεRI, FcγRIIB se fosforila rápidamente en la tirosina en su motivo ITIM, y después recluta la inositol-5-fosfatasa que contiene Src de homología-2 (SHIP), una inositol polifosfato-5-fosfatasa que contiene dominio SH2, que a su vez se fosforila y asocia con Shc y p62^{dok} (p62^{dok} es el prototipo de una familia de moléculas adaptadores, que incluye dominios de señalización tal como un dominio de homología con pleckstrina (dominio PH) en el extremo amino, un dominio a PTB y una región del extremo carboxi que contiene motivos PXXP y numerosos sitios de fosforilación (Carpino *et al.* (1997) "p62(dok): A Constitutively Tyrosine-Phosphorylated, GAP-Associated Protein In Chronic Myelogenous Leukemia Progenitor Cells," *Cell*, 88: 197-204; Yamanshi *et al.* (1997) "*Identification Of The Abl- And rasGAP-Associated 62 kDa Protein As A Docking Protein, Dok*," *Cell*, 88:205-211).

Los anticuerpos anti-FcγRIIB para su uso en la divulgación pueden caracterizarse asimismo por la capacidad de modular una o más respuestas mediadas por IgE. Preferiblemente, se usarán líneas celulares que coexpresan el receptor de alta afinidad por IgE y el receptor de baja afinidad por FcγRIIB en la caracterización de los anticuerpos anti-FcγRIIB en la modulación de las respuestas mediadas por IgE. En una realización específica, se usarán células de una línea celular de leucemia basófila de rata (RBL-H23; Barsumian E.L. *et al.* (1981) "*IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones*," *Eur. J. Immunol.* 11:317-323) transfectada con FcγRIIB humano de longitud completa. RBL-2H3 es una línea celular de rata bien caracterizada que se ha usado ampliamente para estudiar los mecanismos de señalización después de la activación celular mediada por IgE. Cuando se expresa en células RBL-2H3 y se coagrega con FcεRI, FcγRIIB inhibe la movilización de calcio inducida por FcεRI, la desgranulación y la producción de citocinas (Malbec *et al.* (1998) "*Fc Epsilon Receptor I-Associated Lyn-Dependent Phosphorylation Of Fc Gamma Receptor IIB During Negative Regulation Of Mast Cell Activation*," *J. Immunol.* 160:1647-1658; Daeron *et al.* (1995) "*Regulation Of High-Affinity IgE Receptor-Mediated Mast Cell Activation By Murine Low-Affinity IgG Receptors*," *J. Clin. Invest.* 95:577; Ott V. L. (2002) "*Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of FcγRIIB Inhibition Of Fc Epsilon RI Signaling*," *J. Immunol.* 162(9):4430-4439).

Los anticuerpos para su uso en la divulgación también pueden caracterizarse para la inhibición de la activación de mastocitos inducida por FcεRI. Por ejemplo, se sensibilizan células de una línea celular de leucemia basófila de rata (RBL-H23; Barsumian E.L. *et al.* (1981) "*IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones*," *Eur. J. Immunol.* 11:317-323) que se ha transfectado con FcγRIIB con IgE y se estimula con fragmentos F(ab')₂ de IgG de conejo antirratón, para que se agregue a FcεRI en solitario, o con IgG de conejo completa antirratón para que se coagregue con FcγRIIB y FcεRI. En este sistema, la modulación indirecta de las moléculas de señalización posteriores puede ensayarse tras la adición de anticuerpos de la divulgación a las células sensibilizadas y estimuladas. Por ejemplo, puede ensayarse la fosforilación de tirosina de FcγRIIB y el reclutamiento y fosforilación de SHIP, la activación de miembros de la familia de MAP cinasa, incluyendo, aunque sin limitación, Erk1, Erk2, JNK o p38; y la fosforilación de tirosina de p62^{dok} y su asociación con SHIP y RasGAP.

Un ensayo ejemplar para determinar la inhibición de la activación de mastocitos inducida por FcεRI por los anticuerpos de la divulgación puede comprender lo siguiente: transfectar células RBL-H23 con FcγRIIB humano,

- sensibilizar las células RBL-H23 con IgE; estimular las células RBL-H23 con F(ab')₂ de IgG de conejo antirratón (para que se agregue a FcεRI en solitario y provoque la señalización mediada por FcεRI, como control) o estimular células RBL-H23 con IgG de conejo completa antirratón (para que se coagregue con FcγRIIB y FcεRI, provocando la inhibición de la señalización mediada por FcεRI). Las células que se han estimulado con anticuerpos IgG de conejo completos antirratón pueden preincubarse además con los anticuerpos de la divulgación. Medir la actividad dependiente de FcεRI de las células que se han preincubado con los anticuerpos de la divulgación y las células que no se han preincubado con los anticuerpos de la divulgación, y comparar los niveles de la actividad dependiente de FcεRI en estas células indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcεRI por los anticuerpos de la divulgación.
- El ensayo ejemplar descrito anteriormente puede usarse, por ejemplo, para identificar anticuerpos que bloquean la unión del ligando (IgG) al receptor FcγRIIB y antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI evitando la coagregación de FcγRIIB and FcεRI. Este ensayo identifica asimismo anticuerpos que potencian la coagregación de FcγRIIB y FcεRI y agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI promoviendo la coagregación de FcγRIIB y FcεRI.
- En algunas realizaciones, los diacuerpos anti-FcγRIIB, que comprenden los dominios de unión a epítipo de anticuerpos anti-FcγRIIB identificados descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica, de la divulgación se caracterizan por su capacidad de modular una respuesta mediada por IgE controlando y/o midiendo la desgranulación de los mastocitos o basófilos, preferiblemente en un ensayo basado en células. Preferiblemente, los mastocitos o basófilos para su uso en dichos ensayos se han genomanipulado para que contengan FcγRIIB humano usando métodos recombinantes convencionales conocidos para los expertos en la materia. En una realización específica, los anticuerpos anti-FcγRIIB de la divulgación se caracterizan por su capacidad de modular una respuesta mediada por IgE en un ensayo de liberación de β-hexosaminidasa basado en células (enzima contenida en los gránulos). La liberación de β-hexosaminidasa de los mastocitos y los basófilos es un evento principal en afección alérgica aguda e inflamatoria (Aketani *et al.* (2001) "*Correlation Between Cytosolic Calcium Concentration And Degranulation In RBL-2H3 Cells In The Presence Of Various Concentrations Of Antigen-Specific IgEs*," Immunol. Lett. 75: 185-189; Aketani *et al.* (2000) "*A Screening Method For Antigen-Specific IgE Using Mast Cells Based On Intracellular Calcium Signaling*," Anal. Chem. 72: 2653-2658). La liberación de otros mediadores inflamatorios incluyendo, aunque sin limitación, serotonina, e histamina puede ensayarse para medir una respuesta mediado por IgE de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Aunque no sin intención de limitarse a un mecanismo particular de acción, la liberación de los gránulos tales como los que contienen β-hexosaminidasa de los mastocitos y basófilos es un proceso dependiente de la concentración de calcio intracelular que se inicia por la reticulación de FcγRI con antígeno multivalente.
- La capacidad de estudiar mastocitos humanos se ha limitado por la ausencia de cultivos adecuados de mastocitos humanos a largo plazo. Recientemente, se establecieron dos líneas celulares novedosas de mastocitos humanos dependientes de factor de células madre, denominadas LAD 1 y LAD 2, a partir de aspirados de médula ósea de un paciente con sarcoma/leucemia de mastocitos (Kirshenbaum *et al.* (2003) "*Characterization Of Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mast Cell Lines LAD 1 And 2 Established From A Patient With Mast Cell Sarcoma/Leukemia; Activation Following Aggregation Of FcRI Or FcγRI*," Leukemia research, 27:677-82). Se ha descrito que ambas líneas celulares expresan FcεRI y varios marcadores de mastocitos humanos. Pueden usarse células LAD 1 y 2 para evaluar el efecto de los anticuerpos de la divulgación en respuestas mediadas por IgE. En una realización específica, los ensayos de liberación de β-hexosaminidasa basados en células tales como los descritos *supra* pueden usarse en células LAD para determinar cualquier modulación de la respuesta mediada por IgE por los anticuerpos anti-FcγRIIB de la divulgación. En un ensayo ejemplar, se sensibilizan mastocitos humanos, por ejemplo, LAD 1, con IgE humana quimérica antinitrofenol (NP) y se exponen a BSA-NP, el antígeno polivalente, y se controla la desgranulación celular midiendo la β-hexosaminidasa liberada en el sobrenadante (Kirshenbaum *et al.* (2003) "*Characterization Of Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mast Cell Lines LAD 1 And 2 Established From A Patient With Mast Cell Sarcoma/Leukemia; Activation Following Aggregation Of FcRI Or FcγRI*," Leukemia research, 27:677-82).
- En algunas realizaciones, si los mastocitos humanos tienen una baja expresión de FcγRIIB endógeno, determinada usando métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, tinción FACS, puede ser difícil controlar y/o detectar diferencias en la activación de la ruta inhibidora mediada por los diacuerpos anti-FcγRIIB de la divulgación. La expresión FcγRIIB puede regularse por aumento usando citocinas y condiciones de crecimiento particulares. Se ha descrito que FcγRIIB está muy regulado por aumento en líneas celulares de monocitos humanos, por ejemplo, THP1 y U937, (Tridandapani *et al.* (2002) "*Regulated Expression And Inhibitory Function Of FcγRIIB In Human Monocytic Cells*," J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089) y en monocitos humanos primarios (Pricop *et al.* (2001) "*Differential Modulation Of Stimulatory And Inhibitory Fc Gamma Receptors On Human Monocytes By Th1 And Th2 Cytokines*," J. of Immunol., 166: 531-537) por IL4. Se ha descrito que la diferenciación de células U937 con dibutiril AMP cíclico aumenta la expresión de FcγRII (Cameron *et al.* (2002) "*Differentiation Of The Human Monocyte Cell Line, U937, With Dibutyril CyclicAMP Induces The Expression Of The Inhibitory Fc Receptor, FcγRIIB*," Immunology Letters 83, 171-179). Por tanto, la expresión de FcγRIIB endógena en mastocitos humanos para su uso en los métodos puede regularse por aumento usando citocinas, por ejemplo, IL-4, IL-13, para potenciar la sensibilidad de la detección.

Los diacuerpos anti-FcγRIIB también pueden ensayarse para la inhibición de la señalización mediada por el receptor de linfocitos B (BCR). La señalización mediada por BCR puede incluir al menos una o más respuestas biológicas posteriores, tales como la activación y proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos, etc. La coagregación de FcγRIIB y BCR da lugar a la inhibición de la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular. Además, la coagregación de FcγRIIB y BCR da lugar a la inhibición de la señalización mediada por BCR.

Específicamente, la señalización mediada por BCR comprende al menos uno o más de los siguientes: modulación de las moléculas de señalización posteriores (por ejemplo, estados de fosforilación de FcγRIIB, reclutamiento de SHIP, localización de Btk y/o PLCγ, actividad de MAP cinasa, reclutamiento de Akt (señal antiapoptótica), movilización de calcio, progresión del ciclo celular y proliferación celular).

Aunque numerosas funciones efectoras de inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR están mediadas a través de SHIP, recientemente se ha demostrado que los linfocitos B activados por lipopolisacárido (LPS) de ratones deficientes de SHIP muestran inhibición mediada por FcγRIIB significativa de la movilización de calcio, producción de Ins(1,4,5)P₃ y fosforilación de Erk y Akt (Brauweiler *et al.* (2001) "*Partially Distinct Molecular Mechanisms Mediate Inhibitory FcγRIIB Signaling In Resting And Activated B Cells*," Journal of Immunology, 167(1): 204-211). Por consiguiente, pueden usarse linfocitos B *ex vivo* de ratones deficientes de SHIP para caracterizar los anticuerpos de la divulgación. Un ensayo ejemplar para determinar la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR por los anticuerpos de la divulgación puede comprender lo siguiente: aislar linfocitos B esplénicos de ratones deficientes de SHIP, activar dichas células con lipopolisacárido y estimular dichas células con F(ab')₂ anti-IgM para agregar BCR o con anti-IgM para coagregar BCR con FcγRIIB. Las células que se han estimulado con anti-IgM intacto para coagregar BCR con FcγRIIB pueden preincubarse además con los anticuerpos de la divulgación. La actividad dependiente de FcγRIIB de las células puede medirse por técnicas convencionales conocidas en la técnica. Comparar el nivel de la actividad dependiente de FcγRIIB en células que se han preincubado con los anticuerpos y las células que no se han preincubado, y comparar los niveles indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIB por los anticuerpos.

Medir la actividad dependiente de FcγRIIB puede incluir, por ejemplo, medir la movilización de calcio intracelular por citometría de flujo, medir la fosforilación de Akt y/o Erk, medir la acumulación mediada por BCR de PI(3,4,5)P₃ o medir la proliferación mediada por FcγRIIB de linfocitos B.

Los ensayos pueden usarse, por ejemplo, para identificar diacuerpos o anticuerpos anti-FcγRIIB para su uso en la divulgación, que modulan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR bloqueando el sitio de unión de ligando (IgG) al receptor FcγRIIB y antagonizando la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR evitando la coagregación de FcγRIIB y BCR. Los ensayos también pueden usarse para identificar anticuerpos que potencien la coagregación de FcγRIIB y BCR y antagonicen la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR.

Los anticuerpos anti-FcγRIIB también pueden ensayarse para la señalización mediada por FcγRII en monocitos/macrófagos humanos. La coagregación de FcγRIIB con un receptor que albergue el motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) actúa regulando por disminución la fagocitosis mediada por FcγR usando SHIP como efector (Tridandapani *et al.* (2002) "*Regulated Expression And Inhibitory Function Of FcγRIIB In Human Monocytic Cells*," J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089). La coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB provoca una rápida fosforilación del resto de tirosina en el motivo ITIM de FcγRIIB, dando lugar a una potenciación en la fosforilación de SHIP, la asociación de SHIP con Shc y la fosforilación de proteínas que tienen el peso molecular de 120 y 60-65 kDa. Además, la coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB provoca la regulación por disminución de la fosforilación de Akt, que es una serina-treonina cinasa que está implicada en la regulación celular y sirve para suprimir la apoptosis.

Los diacuerpos anti-FcγRIIB también pueden ensayarse para la inhibición de la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos/macrófagos humanos. Por ejemplo, pueden estimularse células de una línea celular monocítica humana, THP-1, con fragmentos Fab de anticuerpo monoclonal de ratón IV.3 contra FcγRII y anticuerpo de cabra antirratón (para agregar FcγRIIA en solitario) o con anticuerpo monoclonal de ratón completo IV.3 y anticuerpo de cabra antirratón (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB). En este sistema, la modulación de las moléculas de señalización posteriores, tal como la fosforilación de tirosina de FcγRIIB, la fosforilación de SHIP, la asociación de SHIP con Shc y la fosforilación de Akt y la fosforilación de proteínas que tienen el peso molecular de 120 y 60-65 kDa pueden ensayarse tras la adición de moléculas de la divulgación a las células estimuladas. Además, la eficacia fagocítica dependiente de FcγRIIB de la línea celular de monocitos puede medirse directamente en presencia y ausencia de los anticuerpos de la divulgación.

Otro ensayo ejemplar para determinar la inhibición de la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos/macrófagos humanos por los anticuerpos de la divulgación puede comprender lo siguiente: estimular células THP-1 con Fab de anticuerpo de ratón IV.3 anti-FcγRII y anticuerpo de cabra antirratón (para agregar FcγRIIA en solitario y provocar la señalización mediada por FcγRIIA); o con anticuerpo de ratón anti-FcγRII y anticuerpo de cabra antirratón (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB e inhibir la señalización mediada por FcγRIIA). Las células que se han estimulado con anticuerpo de ratón anti-FcγRII y anticuerpo de cabra antirratón pueden preincubarse además con las moléculas de

la divulgación. Medir la actividad dependiente de FcγRIIA de las células estimuladas que se han preincubado con moléculas de la divulgación y células que no se han preincubado con los anticuerpos de la divulgación, y comparar los niveles de la actividad dependiente de FcγRIIA en estas células indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos de la divulgación.

- 5 El ensayo ejemplar descrito puede usarse, por ejemplo, para identificar dominios de unión que bloqueen la unión al ligando del receptor FcγRIIB y antagonicen la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA evitando la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA. Este ensayo identifica asimismo dominios de unión que potencian la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA y agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

- 10 Los dominios de unión a FcγRIIB de interés pueden ensayarse mientras estén comprendidos en los anticuerpos midiendo la capacidad de las células THP-1 de fagocitar glóbulos rojos de oveja (SRBC) opsonizados con IgG marcados con fluoresceína por métodos descritos previamente (Tridandapani *et al.* (2000) "*The Adapter Protein LAT Enhances Fcγ Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells*," J. Biol. Chem. 275: 20480-7). Por ejemplo, un ensayo ejemplar para medir la fagocitosis comprende: tratar células THP-1 con los anticuerpos de la divulgación o con un anticuerpo de control que no se una a FcγR, comparar los niveles de actividad de dichas células, en el que una diferencia en las actividades de las células (por ejemplo, actividad de formación de rosetas (el número de células THP-1 que se unen a SRBC recubiertas con IgG), actividad de adherencia (el número total de SRBC unidas a células THP-1) y la tasa fagocítica) indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos de la divulgación. Este ensayo puede usarse para identificar, por ejemplo, anticuerpos que bloqueen la unión al ligando del receptor FcγRIIB y antagonicen la inhibición mediada por FcγRIIB de la fagocitosis.
- 20 Este ensayo también puede identificar anticuerpos que potencien la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

- 25 En una realización preferida, los dominios de unión modulan la actividad dependiente de FcγRIIB en monocitos/macrófagos humanos en al menos una o más de las siguiente maneras: modulación de las moléculas de señalización posteriores (por ejemplo, modulación del estado de fosforilación de FcγRIIB, modulación de la fosforilación de SHIP, modulación de la asociación de SHIP y Shc, modulación de la fosforilación de Akt, modulación de la fosforilación de proteínas adicionales de aproximadamente 120 y 60-65 kDa) y modulación de la fagocitosis.

5.1.2 Dominios de unión a CD16A

- 30 La siguiente sección analiza proteínas de unión a CD16A que pueden usarse como fuentes para regiones variables de cadena ligera y pesada para la producción de diacuerpos covalentes. En la presente divulgación, las proteínas de unión a CD16A incluyen moléculas que comprenden dominios VL y VH de anticuerpos anti-CD16A, cuyos dominios VH y VL se usan en la producción de los diacuerpos de la presente divulgación.

- 35 Puede usarse una diversidad de proteínas de unión a CD16A en relación con la presente divulgación. Las proteínas de unión a CD16A adecuadas incluyen anticuerpos monoclonales humanos o humanizados, así como fragmentos de anticuerpo de unión a CD16A (por ejemplo, scFv o anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, minicuerpos) y otras proteínas de tipo anticuerpo que se unan a CD16A mediante una interacción con un dominio de región variable de cadena ligera, un dominio de región variable de cadena pesada o ambos.

- 40 En algunas realizaciones, la unión a CD16A comprende un dominio VL y/o VH que tiene una o más CDR con secuencias derivadas de un anticuerpo no humano anti-CD16A, tal como un anticuerpo de ratón anti-CD16A y una o más regiones estructurales derivadas de secuencias estructurales de una o más inmunoglobulinas humanas. Se conocen varios anticuerpos monoclonales no humanos anti-CD16A, de los que pueden obtenerse las CDR y otras secuencias (véase, por ejemplo, Tamm *et al.* (1996) "*The Binding Epitopes Of Human CD16 (Fc gamma RIII) Monoclonal Antibodies. Implications For Ligand Binding*," J. Imm. 157:1576-81; Fleit *et al.* (1989) pág. 159; LEUKOCYTE TYPING II: HUMAN MYELOID AND HEMATOPOIETIC CELLS, Reinherz *et al.*, ed. Nueva York: Springer-Verlag; (1986); LEUCOCYTE TYPING III: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS McMichael A J, ed., Oxford: Oxford University Press, 1986); LEUKOCYTE TYPING IV: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Kapp *et al.*, ed. Oxford Univ. Press, Oxford; LEUKOCYTE TYPING V: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Schlossman *et al.*, ed. Oxford Univ. Press, Oxford; LEUKOCYTE TYPING VI: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Kishimoto, ed. Taylor & Francis. Además, como se muestra en los ejemplos, pueden obtenerse nuevas proteínas de unión a CD16A que reconocen CD16A humana expresada en células usando métodos bien conocidos para la producción y selección de anticuerpos monoclonales o proteínas de unión relacionadas (por ejemplo, tecnología de hibridoma, presentación en fagos y similares). Véase, por ejemplo, Connell *et al.* (2002) "*Phage Versus Phagemid Libraries For Generation Of Human Monoclonal Antibodies*," J. Mol. Biol. 321:49-56; Hoogenboom *et al.* (2000) "*Natural And Designer Binding Sites Made By Phage Display Technology*," Imm. Today 21:371078; Krebs *et al.* (2001) "*High-Throughput Generation And Engineering Of Recombinant Human Antibodies*," J. Imm. Methods 254:67-84; y otras referencias citadas en la presente memoria. Los anticuerpos monoclonales de una especie no humana pueden quimerizarse o humanizarse usando técnicas de humanización de anticuerpos conocidas en la técnica.
- 55

Como alternativa, pueden producirse anticuerpos completamente humanos contra CD16A usando animales transgénicos que tengan elementos de un sistema inmunitario humano (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5569825 y 5545806), usando células de sangre periférica humana (Casali *et al.* (1986) "*Human Monoclonals From Antigen-Specific Selection Of B Lymphocytes And Transformation By EBV*," Science 234:476-479), cribando una colección de ADN de linfocitos B humanos de acuerdo con el protocolo general resumido por Huse *et al.* (1989) "*Generation Of A Large Combinatorial Library Of The Immunoglobulin Repertoire In Phage Lambda*," Science 246:1275-1281, y por otros métodos.

En una realización preferida, el donador de unión es del anticuerpo 3G8 o una versión humanizada del mismo, por ejemplo, tales como las divulgadas en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0010124. Se contempla que, para algunos fines, puede ser ventajoso usar proteínas de unión a CD16A que se unan al receptor de CD16A en el mismo epítipo al que se une 3G8, o al menos suficientemente cerca de este epítipo para bloquear la unión por 3G8. Los métodos para el cartografiado de epítopos y los experimentos de unión competitiva para identificar proteínas de unión con las propiedades de unión deseadas son bien conocidos para los expertos en la materia de inmunología experimental. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, citado *supra*; Stähli *et al.* (1983) "*Distinction Of Epitopes By Monoclonal Antibodies*," Methods in Enzymology 92:242-253; Kirkland *et al.* (1986) "*Analysis Of The Fine Specificity And Cross-Reactivity Of Monoclonal Anti-Lipid A Antibodies*," J. Immunol. 137:3614-3619; Morel *et al.* (1988) "*Monoclonal Antibodies To Bovine Serum Albumin: Affinity And Specificity Determinations*," Molec. Immunol. 25:7-15; Cheung *et al.* (1990) "*Epitope-Specific Antibody Response To The Surface Antigen Of Duck Hepatitis B Virus In Infected Ducks*," Virology 176:546-552; y Moldenhauer *et al.* (1990) "*Identity Of HML-1 Antigen On Intestinal Intraepithelial T Cells And Of B-ly7 Antigen On Hairy Cell Leukaemia*," Scand. J. Immunol. 32:77-82. Por ejemplo, es posible determinar si dos anticuerpos se unen al mismo sitio usando uno de los anticuerpos para capturar el antígeno en una placa de ELISA y después midiendo la capacidad del segundo anticuerpo de unirse al antígeno capturado. La comparación de epítopos también puede conseguirse marcando un primer anticuerpo, directa o indirectamente, con una enzima, radionúclido o fluoróforo, y midiendo la capacidad de un segundo anticuerpo no marcado de inhibir la unión del primer anticuerpo al antígeno en células, en disolución o en una fase sólida.

También es posible medir la capacidad de los anticuerpos de bloquear la unión del receptor de CD16A a complejos inmunitarios formados en placas de ELISA. Dichos complejos inmunitarios se forman recubriendo en primer lugar la placa con un antígeno tal como fluoresceína, después aplicando un anticuerpo antifluoresceína específico a la placa. Este complejo inmunitario entonces sirve como ligando para receptores de Fc solubles tales como sFcR1IIa. Como alternativa, puede formarse un complejo inmunitario soluble y marcarse, directa o indirectamente, con una enzima, radionúclido o fluoróforo. Después puede medirse la capacidad de los anticuerpos de inhibir la unión de estos complejos inmunitarios marcados a receptores de Fc en células, en disolución o en una fase sólida.

Las proteínas de unión a CD16A pueden comprender o no una región Fc de inmunoglobulina humana. Las regiones Fc no están presentes, por ejemplo, en proteínas de unión de scFv. Las regiones Fc están presentes, por ejemplo, en anticuerpos IgG monoclonales tetraméricos humanos o humanizados. Como se describe *supra*, en algunas realizaciones de la presente divulgación, la proteína de unión a CD16A incluye una región Fc que tiene una función efectora alterada, por ejemplo, afinidad reducida por un ligando efector tal como un receptor de Fc o componente C1 del complemento en comparación con la región Fc inalterada (por ejemplo, Fc de proteínas IgG1 de origen natural). En una realización, la región Fc no está glucosilada en el aminoácido de la región Fc correspondiente a la posición 297. Dichos anticuerpos carecen de función efectora Fc.

Por tanto, la proteína de unión a CD16A puede no mostrar unión mediada por Fc a un ligando efector tal como un receptor de Fc o el componente C1 del complemento debido a la ausencia del dominio Fc en la proteína de unión mientras que, en otros casos, la ausencia de unión o función efectora se debe a una alteración en la región constante del anticuerpo.

5.1.2.1 Proteínas de unión a CD16A que comprenden secuencias CDR similares a secuencias CDR de mAb 3G8.

Las proteínas de unión a CD16A que pueden usarse en la práctica de la divulgación incluyen proteínas que comprenden una secuencia CDR derivada de (es decir, que tiene una secuencia igual o similar a) las CDR del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8. Se clonaron y secuenciaron ADNc complementarios que codifican las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8, incluyendo las secuencias que codifican CDR, como se describe. Las secuencias de ácido nucleico y proteínica de 3G8 se proporcionan a continuación. Usando la región variable de ratón y las secuencias CDR, se produjo una gran cantidad de anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden regiones determinantes de complementariedad derivadas de CDR de 3G8 y se analizaron sus propiedades. Para identificar anticuerpos humanizados que se unan a CD16A con alta afinidad y que tengan otras propiedades deseables, se produjeron cadenas pesadas de anticuerpo que comprendían una región VH con las CDR derivadas de 3G8 y se combinaron (por coexpresión) con cadenas ligeras de anticuerpo que comprendían una región VL con las CDR derivadas de 3G8 para producir un anticuerpo tetramérico para su análisis. Las propiedades de los anticuerpos tetraméricos resultantes se determinaron como se describe a continuación. Como se describe a continuación, las proteínas de unión a CD16A que comprenden las

CDR de 3G8, tales como las proteínas de anticuerpo humanizado descritas en la presente memoria, pueden usarse de acuerdo con la divulgación.

5.1.2.1.1 Región VH

5 La proteína de unión a CD16A puede comprender un dominio variable de cadena pesada en que al menos una CDR (y habitualmente tres CDR) tiene la secuencia de una CDR (y más típicamente las tres CDR) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8 y para la que las partes restantes de la proteína de unión son sustancialmente humanas (derivadas de y sustancialmente similares a, la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o anticuerpos humanos).

10 También se describe un anticuerpo 3G8 humanizado o fragmento de anticuerpo que contiene CDR derivadas del anticuerpo 3G8 en una estructura sustancialmente humana, pero en que al menos una de las CDR del dominio variable de cadena pesada difiere en la secuencia de la correspondiente CDR de cadena pesada del anticuerpo de ratón 3G8. Por ejemplo, en una realización, la o las CDR difieren de la secuencia CDR de 3G8 al menos en una o más sustituciones de CDR mostradas que se sabe en la técnica que afectan a la unión de 3G8 a CD16A, como se sabe en la técnica o como se divulga en las tablas 3 y 4A-H. Las proteínas de unión a CD16 adecuadas pueden comprender 0, 1, 2, 3 o 4, o más de estas sustituciones (y a menudo tienen de 1 a 4 de estas sustituciones) y

15 opcionalmente pueden tener sustituciones adicionales también.

Tabla 3. Sustituciones del dominio V_H

N.º	Posición de Kabat	Región	Sustituciones
1	2	FR1	Ile
2	5	FR1	Lys
3	10	FR1	Thr
4	30	FR1	Arg
5	34	CDR1	Val
6	50	CDR2	Leu
7	52	CDR2	Phe o
			Tyr o
			Asp
8	54	CDR2	Asn
9	60	CDR2	Ser
10	62	CDR2	Ser
11	70	FR3	Thr
12	94	FR3	Gln o
			Lys o
			Ala o
			His
13	99	CDR3	Tyr
14	101	CDR3	Asp

Tabla 4A. Secuencias de V_H derivadas de V_H de 3G8*

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4

ES 2 733 067 T3

3G8VH	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>
Ch3G8VH	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
HxC	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
CxH	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-1	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-2	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-3	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-4	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>B</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-5	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-6	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-7	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-8	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-9	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-10	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-11	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-12	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-13	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>D</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-14	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-15	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-16	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-17	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-18	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-19	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-20	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-21	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>B</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-22	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-23	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-24	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-25	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-26	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-27	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-28	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-29	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-30	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-31	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>

ES 2 733 067 T3

Hu3G8VH-32	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>H</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-33	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>H</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-34	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-35	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-36	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>H</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-37	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>H</u>	<u>E</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-38	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>F</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-39	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>I</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-40	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>G</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-41	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>J</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-42	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-43	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-44	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-45	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>J</u>	<u>D</u>	<u>B</u>

*Las letras en la tabla 4A se refieren a secuencias de las tablas 4 B-H.

Tabla 4B: FR1

A	B	C	D	E		RESTO
Q	Q	Q	Q	Q		1
V	V	V	V	I		2
T	T	T	T	T		3
L	L	L	L	L		4
K	R	K	R	K		5
E	E	E	E	E		6
S	S	S	S	S		7
G	G	G	G	G		8
P	P	P	P	P		9
G	A	A	A	T		10
I	L	L	L	L		11
L	V	V	V	V		12
Q	K	K	K	K		13
P	P	P	P	P		14
S	T	T	T	T		15
Q	Q	Q	Q	Q		16

ES 2 733 067 T3

T	T	T	T	T		17
L	L	L	L	L		18
S	T	T	T	T		19
L	L	L	L	L		20
T	T	T	T	T		21
C	C	C	C	C		22
S	T	T	T	T		23
F	F	F	F	F		24
S	S	S	S	S		25
G	G	G	G	G		26
F	F	F	F	F		27
S	S	S	S	S		28
L	L	L	L	L		29
R	S	S	R	S		30
103	104	105	106	107		SEQ ID NO:

SEQ ID NO:	Secuencia
103	QVTLKESGPGILQPSQTLTLTCSFSGFSLR
104	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
105	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
106	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLR
107	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLS

Tabla 4C: CDR1

A	B		RESTO
T	T		31
S	S		32
G	G		33
M	V		34
G	G		35
V	V		35A
G	G		35B
108	109		SEQ ID NO:

ES 2 733 067 T3

SEQ ID NO:	Secuencia
108	TSGMGVG
109	TSGVGVG

Tabla 4D: FR2

A	B		RESTO
W	W		36
I	I		37
R	R		38
Q	Q		39
P	P		40
S	P		41
G	G		42
K	K		43
G	A		44
L	L		45
E	E		46
W	W		47
L	L		48
A	A		49
110	111		SEQ ID NO:

5

SEQ ID NO:	Secuencia
110	WIRQPSGKGLEWLA
111	WIRQPPGKALEWLA

Tabla 4E: CDR2

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	RESTO
H	H	H	H	H	L	H	L	H	L	50
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	51
W	Y	W	Y	W	D	F	W	D	W	52
W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	53

ES 2 733 067 T3

D	N	D	D	N	D	D	D	D	N	54
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	55
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	56
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	57
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	58
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	59
N	N	S	N	N	S	S	S	S	S	60
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	61
A	A	S	A	A	S	S	S	S	S	62
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	63
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	64
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	65
112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	SEQ ID NO:

SEQ ID NO:	Secuencia
112	HIWWDDDKRYNPALKS
113	HIYWNDDKRYNPALKS
114	HIWWDDDKRYSPSLKS
115	HIYWDDDKRYNPALKS
116	HIWWNDDKRYNPALKS
117	LIDWDDDKRYSPSLKS
118	HIFWDDDKRYSPSLKS
119	LIWWDDDKRYSPSLKS
120	HIDWDDDKRYSPSLKS
121	LIWWNDDKRYSPSLKS

Tabla 4F: FR3

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Resto
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	66
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	67
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	68
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	69
S	S	S	S	S	S	S	T	T	T	70
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	71
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	72
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	73
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	74
S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	75
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	76
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	77
V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	78
F	V	V	V	V	V	V	V	V	V	79
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	80
K	T	T	T	T	T	T	T	T	T	81
I	M	M	M	M	M	M	M	M	M	82
A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	82A
S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	82B
V	M	M	M	M	M	M	M	M	M	82C

D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	83
T	P	P	P	P	P	P	P	P	P	84
A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	85
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	86
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	87
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	88
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	89
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	90
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	91
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	92
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	93
Q	R	Q	T	K	A	H	R	H	Q	94
122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	82 SEQ ID NO.
132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	82A SEQ ID NO.
142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	82B SEQ ID NO.
152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	82C SEQ ID NO.

SEQ ID NO.	Secuencia
122	RLTISKDTSSNQVFLKIDTADTATYYCAQ
123	RLTISKDTSKNQVVLTMDFVDTATYYCAR
124	RLTISKDTSKNQVVLTMDFVDTATYYCAQ
125	RLTISKDTSKNQVVLTMDFVDTATYYCAI
126	RLTISKDTSKNQVVLTMDFVDTATYYCAK
127	RLTISKDTSKNQVVLTMDFVDTATYYCAA
128	RLTISKDTSKNQVVLTMDFVDTATYYCAH
129	RLTITKDTSKNQVVLTMDFVDTATYYCAR
130	RLTITKDTSKNQVVLTMDFVDTATYYCAH
131	RLTITKDTSKNQVVLTMDFVDTATYYCAQ
132	RLTISKDTSSNQVFLKADTADTATYYCAQ
133	RLTISKDTSKNQVVLTTDFVDTATYYCAR
134	RLTISKDTSKNQVVLTTDFVDTATYYCAQ
135	RLTISKDTSKNQVVLTTDFVDTATYYCAI
136	RLTISKDTSKNQVVLTTDFVDTATYYCAK
137	RLTISKDTSKNQVVLTTDFVDTATYYCAA
138	RLTISKDTSKNQVVLTTDFVDTATYYCAH
139	RLTITKDTSKNQVVLTTDFVDTATYYCAR
140	RLTITKDTSKNQVVLTTDFVDTATYYCAH
141	RLTITKDTSKNQVVLTTDFVDTATYYCAQ
142	RLTISKDTSSNQVFLKSDTADTATYYCAQ
143	RLTISKDTSKNQVVLTNDFVDTATYYCAR
144	RLTISKDTSKNQVVLTNDFVDTATYYCAQ
145	RLTISKDTSKNQVVLTNDFVDTATYYCAI

SEQ ID NO.	Secuencia
146	RLTISKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAK
147	RLTISKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAA
148	RLTISKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAH
149	RLTITKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAR
150	RLTITKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAH
151	RLTITKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAQ
152	RLTISKDTSSNQVFLKVDATATATYYCAQ
153	RLTISKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAR
154	RLTISKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAQ
155	RLTISKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAT
156	RLTISKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAK
157	RLTISKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAA
158	RLTISKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAH
159	RLTITKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAR
160	RLTITKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAH
161	RLTITKDTSKNQVVLNDPVDATATYYCAQ

Tabla 4G: CDR3

A	B	C	D	RESTO
I	I	I	I	95
N	N	N	N	96
P	P	P	P	97
A	A	A	A	98
W	W	Y	Y	99
F	F	F	F	100
A	D	A	D	101
Y	Y	Y	Y	102
162	163	164	165	SEQ ID NO:

SEQ ID NO:	Secuencia
162	INPAWFAY
163	INPAWFDY
164	INPAYFAY
165	INPAYFDY

5

Tabla 4H: FR4

A	B		RESTO

W	W		103
G	G		104
Q	Q		105
G	G		106
T	T		107
L	L		108
V	V		109
T	T		110
V	V		111
S	S		112
A	S		113
166	167		SEQ ID NO:

SEQ ID NO:	Secuencia
166	WGQGTLTVSA
167	WGQGTLTVSS

5 En una realización, una proteína de unión a CD16A puede comprender una secuencia de dominio variable de cadena pesada que es igual que, o similar a, el dominio VH de la construcción Hu3G8VH-1, cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO: 68. Por ejemplo, la descripción proporciona una proteína de unión a CD16A que comprende un dominio VH con una secuencia que (1) difiere del dominio VH de Hu3G8VH-1 (SEQ ID NO: 68) en cero, una o más de una de las sustituciones en CDR expuestas en la tabla 1; (2) difiere del dominio VH de Hu3G8VH-1 en cero, una o más de una de las sustituciones en la región estructural expuestas en la tabla 1; y (3) es al menos aproximadamente un 80 % idéntica, a menudo al menos aproximadamente un 90 %, y a veces al menos aproximadamente un 95 % idéntica, o incluso al menos aproximadamente un 98 % idéntica a la secuencia de VH de Hu3G8VH-1 en las posiciones restantes.

15 Los dominios VH ejemplares de proteínas de unión a CD16 tienen la secuencia de 3G8VH, Hu3G8VH-5 y Hu3G8VH-22 (SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70, respectivamente). Las secuencias de nucleótidos ejemplares que codifican las secuencias de 3G8VH y Hu3G8VH-5 (SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 69, respectivamente) se proporcionan por la SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81, respectivamente.

20 El dominio VH puede tener una secuencia que difiere de la de Hu3G8VH-1 (SEQ ID NO: 68) en al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos 4, al menos cinco o al menos seis de las sustituciones mostradas en la tabla 3. Se cree que estas sustituciones provocan afinidad aumentada por CD16A y/o reducen la inmunogenicidad de una proteína de unión a CD16A cuando se administra a seres humanos. En determinadas realizaciones, el grado de identidad de secuencia con el dominio VH de Hu3G8VH-1 en las posiciones restantes es de al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 98 %.

25 Por motivos de ilustración y no de limitación, las secuencias de varios dominios VH de la proteína de unión a CD16A se muestran en la tabla 4. Las cadenas pesadas que comprenden estas secuencias fusionadas a una región constante Cy1 humana se coexpresaron con la cadena ligera de hu3G8VL-1 (descrita a continuación) para formar anticuerpos tetraméricos, y se midió la unión de los anticuerpos a CD16A para evaluar el efecto de sustituciones de aminoácido en comparación con el dominio VH de hu3G8VH-1. Construcciones en que el dominio VH tiene una secuencia de hu3G8VH-1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 42, 43, 44 y 45 mostraron unión de alta afinidad, mostrando los dominios VH de hu3G8VH-6 y -40 VH unión intermedia. Las proteínas de unión a CD16A que comprenden los dominios VH de hu3G8VH-5 y hu3G8VH-22 (SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70, respectivamente) se considera que tienen propiedades de unión particularmente favorables.

5.1.2.2 Región VL

Se realizaron estudios similares para identificar secuencias de dominio variable de cadena ligera con propiedades de unión favorables. También se describe una proteína de unión a CD16A que contiene un dominio variables de cadena ligera en que al menos una CDR (y sustancialmente tres CDR) tiene la secuencia de una CDR (y más típicamente las tres CDR) de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8 y para la que las partes restantes de la proteína de unión son sustancialmente humanas (derivadas de y sustancialmente similares a, la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o anticuerpos humanos).

También se describe un fragmento de un anticuerpo 3G8 humanizado que contiene CDR derivadas del anticuerpo 3G8 en una estructura sustancialmente humana, pero en que al menos una de las CDR del dominio variable de cadena ligera difiere en la secuencia de la CDR de cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8. En una realización, la o las CDR difieren de la secuencia de 3G8 al menos porque tiene una o más sustituciones de aminoácido en una CDR, tales como una o más sustituciones mostradas en la tabla 2 (por ejemplo, arginina en la posición 24 en CDR1; serina en la posición 25 en CDR1; tirosina en la posición 32 en CDR1; leucina en la posición 33 en CDR1; ácido aspártico, triptófano o serina en la posición 50 en CDR2; serina en la posición 53 en CDR2; alanina o glutamina en la posición 55 en CDR2; treonina en la posición 56 en CDR2; serina en la posición 93 en CDR3; y/o treonina en la posición 94 en CDR3). En diversas realizaciones, el dominio variable puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas sustituciones (y a menudo tiene de 1 a 4 de estas sustituciones) y, opcionalmente, puede tener sustituciones adicionales también.

En una realización, una proteína de unión a CD16A adecuada puede comprender una secuencia de dominio variable de cadena ligera que es igual que, o similar a, el dominio VL de la construcción Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71), cuya secuencia se proporciona en la tabla 6. Por ejemplo, la descripción proporciona una proteína de unión a CD16A que comprende un dominio VL con una secuencia que (1) difiere del dominio VL de Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71) en cero, una o más de las sustituciones en CDR expuestas en la tabla 5; (2) difiere del dominio VL de Hu3G8VL-1 en cero, una o más de las sustituciones en la región estructural expuestas en la tabla 5; y (3) es al menos aproximadamente un 80 % idéntica, a menudo al menos aproximadamente un 90 %, y a veces al menos aproximadamente un 95 % idéntica, o incluso al menos aproximadamente un 98 % idéntica a la secuencia de VL de Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71) en las posiciones restantes.

Tabla 5. Sustituciones en el dominio VL de 3G8

N.º	Posición de Kabat	Región	Sustituciones
1	24	CDR1	Arg
2	25	CDR1	Ser
3	32	CDR1	Tyr
4	33	CDR1	Leu
5	50	CDR2	Asp o Trp o Ser
6	51	CDR2	Ala
7	53	CDR2	Ser
8	55	CDR2	Ala o Gln
9	56	CDR2	Thr
10	93	CDR3	Ser
11	94	CDR3	Thr

Tabla 6. Secuencias de VL derivadas de VL de 3G8*

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VL	A	A	A	A	A	A	A

ES 2 733 067 T3

Hu3G8VL-1	B	A	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-2	B	B	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-3	B	C	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-4	B	D	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-5	B	E	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-6	B	F	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-7	B	G	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-8	B	A	A	B	B	A	B
Hu3G8VL-9	B	A	A	C	B	A	B
Hu3G8VL-10	B	A	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-11	B	A	A	E	B	A	B
Hu3G8VL-12	B	A	A	F	B	A	B
Hu3G8VL-13	B	A	A	G	B	A	B
Hu3G8VL-14	B	A	A	A	B	B	B
Hu3G8VL-15	B	A	A	A	B	C	B
Hu3G8VL-16	B	A	A	A	B	D	B
Hu3G8VL-17	B	A	A	A	B	E	B
Hu3G8VL-18	B	B	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-19	B	B	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-20	B	B	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-21	B	C	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-22	B	C	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-23	B	C	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-24	B	D	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-25	B	D	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-26	B	D	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-27	B	E	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-28	B	E	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-29	B	E	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-30	B	A	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-31	B	A	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-32	B	A	A	H	B	A	B
Hu3G8VL-33	B	A	A	I	B	A	B
Hu3G8VL-34	B	A	A	J	B	A	B
Hu3G8VL-35	B	B	A	H	B	D	B

ES 2 733 067 T3

Hu3G8VL-36	B	C	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-37	B	E	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-38	B	B	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-39	B	C	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-40	B	E	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-41	B	B	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-42	B	C	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-43	B	E	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-44	B	A	A	K	B	A	B

*Las letras en la tabla 6A se refieren a secuencias de las tablas 6B-H.

Tabla 6B: FR1

A	B	RESTO
D	D	1
T	I	2
V	V	3
L	M	4
T	T	5
Q	Q	6
S	S	7
P	P	8
A	D	9
S	S	10
L	L	11
A	A	12
V	V	13
S	S	14
L	L	15
G	G	16
Q	E	17
R	R	18
A	A	19
T	T	20
I	I	21
S	N	22

C	C	23
168	169	SEQ ID NO:

SEQ ID NO:	Secuencia
168	DTVLTQSPASLAVSL
169	DIVMTQSPDSLAVSL

Tabla 6C: CDR1

A	B	C	D	E	F	G	RESTO
K	R	K	K	K	K	K	24
A	A	S	A	A	A	A	25
S	S	S	S	S	S	S	26
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	27
S	S	S	S	S	S	S	27A
V	V	V	V	V	V	V	27B
D	D	D	D	D	D	D	27C
F	F	F	F	F	F	F	27D
D	D	D	D	D	D	D	28
G	G	G	G	G	G	G	29
D	D	D	D	D	D	D	30
S	S	S	S	S	S	S	31
F	F	F	Y	F	F	Y	32
M	M	M	M	L	M	L	33
N	N	N	N	N	A	A	34
170	171	172	173	174	175	176	27 SEQ ID NO
177	178	179	180	181	182	183	27A SEQ ID NO
184	185	186	187	188	189	190	27B SEQ ID NO
191	192	193	194	195	196	197	27C SEQ ID NO
198	199	200	201	202	203	204	27D SEQ ID NO

SEQ ID NO.	Secuencia
170	KASQDGDSFMN

SEQ ID NO.	Secuencia
171	RASQDGDSFMN
172	KSSQDGDSFMN
173	KASQDGDSYMN
174	KASQDGDSFLN
175	KASQDGDSFMA
176	KASQDGDSYLA
177	KASSDGDSFMN
178	RASSDGDSFMN
179	KSSSDGDSFMN
180	KASSDGDSYMN
181	KASSDGDSFLN
182	KASSDGDSFMA
183	KASSDGDSYLA
184	KASVDGDSFMN
185	RASVDGDSFMN
186	KSSVDGDSFMN
187	KASVDGDSYMN
188	KASVDGDSFLN
189	KASVDGDSFMA
190	KASVDGDSYLA
191	KASDDGDSFMN
192	RASDDGDSFMN
193	KSSDDGDSFMN
194	KASDDGDSYMN
195	KASDDGDSFLN
196	KASDDGDSFMA
197	KASDDGDSYLA
198	KASFDGDSFMN
199	RASFDGDSFMN
200	KSSFDGDSFMN
201	KASFDGDSYMN
202	KASFDGDSFLN
203	KASFDGDSFMA
204	KASFDGDSYLA

Tabla 6D: FR2

A	RESTO
W	35
Y	36
Q	37
Q	38

ES 2 733 067 T3

K	39
P	40
G	41
Q	42
P	43
P	44
K	45
L	46
L	47
I	48
Y	49
205	SEQ ID NO:

SEQ ID NO:	Secuencia
205	WYQQKAPGQPPKLLIY

Tabla 6E: CDR2

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	RESTO
T	D	W	T	D	D	S	S	S	T	T	50
T	A	A	T	A	A	A	T	T	T	T	51
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	52
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	53
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	54
E	E	E	E	E	A	Q	E	Q	Q	Q	55
S	S	S	T	T	T	S	S	S	S	S	56
206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	SEQ ID NO:

5

SEQ ID NO:	Secuencia
206	TTSNLES
207	DASNLES
208	WASNLES
209	TTSNLET
210	DASNLET

ES 2 733 067 T3

211	DASNLAT
212	SASNLQS
213	STSNLES
214	STSNLQS
215	TTSNLQS
216	TTSSLQS

Tabla 6F: FR3

A	B	RESTO
G	G	57
I	V	58
P	P	59
A	D	60
R	R	61
F	F	62
S	S	63
A	G	64
S	S	65
G	G	66
S	S	67
G	G	68
T	T	69
D	D	70
F	F	71
T	T	72
L	L	73
N	T	74
I	I	75
H	S	76
P	S	77
V	L	78
E	Q	79
E	A	80

ES 2 733 067 T3

E	E	81
D	D	82
T	V	83
A	A	84
T	V	85
Y	Y	86
Y	Y	87
C	C	88
217	218	SEQ ID NO:

SEQ ID NO:	Secuencia
217	GIPARFSASGSGTDFTLNHPVEEEDTATYYC
218	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC

Tabla 6G: CDR3

A	B	C	D	E	RESTO
Q	Q	Q	Q	Q	89
Q	Q	Q	Q	Q	90
S	S	S	S	S	91
N	Y	Y	N	N	92
E	S	E	S	E	93
D	T	D	D	T	94
P	P	P	P	P	95
Y	Y	Y	Y	Y	96
T	T	T	T	T	97
219	220	221	222	223	SEQ ID NO:

SEQ ID NO:	Secuencia
219	QQSNEDPYT
220	QQSYSTPYT
221	QQSYEDPYT
222	QQSNSDPYT
223	QQSNETPYT

Tabla 6H: FR4

A	B	RESTO
F	F	98
G	G	99
G	Q	100
G	G	101
T	T	102
K	K	103
L	L	104
E	E	105
I	I	106
K	K	107
224	225	SEQ ID NO:

SEQ ID NO:	Secuencia
224	FGGGTKLEIK
225	FGQGTKLEIK

5 Los dominios VL ejemplares de proteínas de unión a CD16 tienen la secuencia de 3G8VL, Hu3G8VL-1 o Hu3G8VL-43 (SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72, respectivamente) como se muestra en las tablas 5 y 6. Las secuencias ejemplares que codifican 3G8VL (SEQ ID NO: 82) y Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71) se proporcionan en la SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84, respectivamente.

10 El dominio VL puede tener una secuencia que difiere de la de Hu3G8VL1 (SEQ ID NO: 71) en cero, una, al menos dos, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8 o al menos 9 de las sustituciones mostradas en la tabla 2. Se cree que estas sustituciones provocan afinidad aumentada por CD16A y/o reducen la inmunogenicidad de una proteína de unión a CD16A cuando se administra a seres humanos. En determinadas realizaciones, el grado de identidad de secuencia en las posiciones restantes es de al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 98 %.

15 Por motivos de ilustración y no de limitación, las secuencias de varios dominios VL de proteínas de unión a CD16A se muestran en la tabla 6. Las cadenas ligeras que comprenden estas secuencias fusionadas a un dominio constante Ck humano se coexpresaron con una cadena pesada de Hu3G8VH (descrita anteriormente) para formar anticuerpos tetraméricos, y se midió la unión de los anticuerpos a CD16A para evaluar el efecto de sustituciones de aminoácido en comparación con el dominio VL de Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71). Construcciones en que el dominio VL tiene una secuencia de hu3G8VL-1, 2, 3, 4, 5, 10, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 27, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 42 mostraron unión de alta afinidad y hu3G8VL-15, 17, 20, 23, 25, 26, 29, 30, 31, 38, 39, 40 y 41 mostraron unión intermedia. Las proteínas de unión a CD16A que comprenden los dominios VL de hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 y hu3G8VL-43 se considera que tienen propiedades de unión particularmente favorables (SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 72, respectivamente).

5.1.2.2.1 Combinaciones de dominios VL y/o VH

Como se sabe en la técnica y se describe en otra parte en la presente memoria, las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina pueden expresarse de forma recombinante en condiciones en que se asocian para producir un díptico, o pueden combinarse así *in vitro*. Por tanto, se apreciará que un dominio VL derivado de 3G8 descrito en

la presente memoria puede combinarse con un dominio VH derivado de 3G8 descrito en la presente memoria, para producir un diacuerpo de unión a CD16A, y se contemplan todas estas combinaciones.

Por motivos de ilustración y no de limitación, ejemplos de diacuerpos contra CD16A útiles son aquellos que comprenden al menos un dominio VH y al menos un dominio VL, donde el dominio VH es de hu3G8VH-1, hu3G8VH-22 o hu3G8VH-5 (SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 69, respectivamente) y el dominio VL es de hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 o hu3G8VL-43 (SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 41, respectivamente). En particular, anticuerpos humanizados que comprenden hu3G8VH-22 (SEQ ID NO: 22) y hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 o hu3G8VL-43 (SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 72, respectivamente), o hu3G8VH-5 (SEQ ID NO: 69) y hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71) tienen propiedades favorables.

Los expertos en la materia apreciarán que las secuencias de los dominios VL y VH aquí descritos pueden modificarse adicionalmente por métodos conocidos en la técnica tales como maduración de la afinidad (véase, Schier *et al.* (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site," J. Mol. Biol. 263:551-567; Daugherty *et al.* (1998) "Antibody Affinity Maturation Using Bacterial Surface Display," Protein Eng. 11:825-832; Boder *et al.* (1997) "Yeast Surface Display For Screening Combinatorial Polypeptide Libraries," Nat. Biotechnol. 15:553-557; Boder *et al.* (2000) "Directed Evolution Of Antibody Fragments With Monovalent Femtomolar Antigen-Binding Affinity," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 97:10701-10705; Hudson *et al.* (2003) "Engineered Antibodies," Nature Medicine 9:129-39). Por ejemplo, las proteínas de unión a CD16A pueden modificarse usando técnicas de maduración de la afinidad para identificar proteínas con afinidad aumentada por CD16A y/o afinidad disminuida por CD16B.

Una proteína de unión a CD16 ejemplar es el anticuerpo de ratón 3G8. Se describen secuencias de aminoácidos que comprenden los dominios VH y VL de 3G8 humanizado en las figuras 2, 9, 14 y se exponen en las SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72.

5.2 Diacuerpos que comprenden regiones Fc o partes de las mismas

Se describen moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc o partes de los mismos (por ejemplo, un dominio CH2 o CH3). En determinadas realizaciones, el dominio Fc, o parte o partes del mismo, comprende uno o más dominios constantes de la región Fc de IgG2, IgG3 o IgG4 (por ejemplo, CH2 o CH3). También se describen moléculas que comprenden un dominio Fc o parte del mismo, en las que dicho dominio Fc o parte del mismo comprende al menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, sustitución) con respecto a un dominio Fc de tipo silvestre comparable o parte del mismo. Los dominios Fc variantes son bien conocidos en la técnica, y se usan principalmente para alterar el fenotipo del anticuerpo que comprende dicho dominio Fc variante que se ensaya en cualquiera de los ensayos de actividad de unión o función efectora bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISA, análisis de SPR o ADCC. Dichos dominios Fc variantes, o partes de los mismos, tienen uso en la presente divulgación confiriendo o modificando la función efectora presentada por una molécula de diacuerpo de la divulgación que comprende un dominio Fc (o parte del mismo) que se ensaya funcionalmente, por ejemplo, en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófagos. Las variantes del dominio Fc identificadas que alteran la función efectora se divulgan en la solicitud internacional WO 04/063351, las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos 2005/0037000 y 2005/0064514, y las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2006-0134709 A1, presentada el 10 de noviembre de 2005, y 2006-0177439 A1 presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitadas simultáneamente de los autores de la invención.

También se describe en uso de cualquier variante de Fc conocida en la técnica, tales como las divulgadas en Duncan *et al.* (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG," Nature 332:563-564; Lund *et al.* (1991) "Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG," J. Immunol. 147:2657-2662; Lund *et al.* (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma RII," Mol. Immunol. 29:53-59; Alegre *et al.* (1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo," Transplantation 57:1537-1543; Hutchins *et al.* (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H," Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92:11980-11984; Jefferis *et al.* (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation," Immunol. Lett. 44:111-117; Lund *et al.* (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors," FASEB J. 9:115-119; Jefferis *et al.* (1996) "Modulation Of Fc (Gamma) R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions," Immunol. Lett. 54:101-104; Lund *et al.* (1996) "Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains," J. Immunol. 157:4963-4969; Armour *et al.* (1999) "Recombinant Human IgG Molecules Lacking Fc gamma Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities," Eur. J. Immunol. 29:2613-2624; Idusogie *et al.* (2000) "Mapping Of The C1Q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG1 Fc," J. Immunol. 164:4178-4184; Reddy *et al.* (2000) "Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4," J. Immunol. 164:1925-1933; Xu *et al.* (2000) "In

Vitro Characterization Of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies," Cell. Immunol. 200:16-26; Idusogie et al. (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement," J. Immunol. 166:2571-2575; Shields et al. (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIIL, And FcRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc gamma R," J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Jefferis et al. (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For Fc gamma R: Current Models," Immunol. Lett. 82:57-65; Presta et al. (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function," Biochem. Soc. Trans. 30:487-490; documento US 5624821; documento US 5885573; documento US 6194551; documento PCT WO 00/42072; documento PCT WO 99/58572.

En determinadas realizaciones, dicha una o más modificaciones a los aminoácidos de la región Fc reducen la afinidad y avidéz de la región Fc y, por tanto, la molécula de diacuerpo de la divulgación, por uno o más receptores FcγR. También se describen diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o parte de la misma, en los que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, que es una región Fc variante que se une únicamente a un FcγR, en los que dicho FcγR es FcγRIIA. Los diacuerpos pueden comprender como alternativa una región Fc variante, o parte de la misma, en los que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, que es una región Fc variante que se une únicamente a un FcγR, en los que FcγR es FcγRIIA. Como alternativa, los diacuerpos pueden comprender una región Fc variante, o parte de la misma, en los que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, que es una región Fc variante que se une únicamente a un FcγR, en los que dicho FcγR es FcγRIIB. También se describen moléculas que comprenden un dominio Fc variante en las que dicha variante confiere o media la actividad ADCC aumentada y/o una unión aumentada a FcγRIIA (CD32A), con respecto a una molécula que no comprende dominio Fc o que comprende un dominio Fc de tipo silvestre, que se mide usando métodos conocidos para los expertos en la materia y descritos en la presente memoria. Como alternativa, las moléculas pueden comprender un dominio Fc variante en las que dicha variante confiere o media la actividad ADCC disminuida (u otra función efectora) y/o una unión aumentada a FcγRIIB (CD32B), con respecto a una molécula que no comprende dominio Fc o que comprende un dominio Fc de tipo silvestre, que se mide usando métodos conocidos para los expertos en la materia y descritos en la presente memoria.

Se describe el uso de un dominio Fc que comprende dominios o regiones de dos o más isotipos de IgG. Como se sabe en la técnica, la modificación de aminoácidos de la región Fc puede afectar profundamente a la función efectora mediada por Fc y/o la actividad de unión. Sin embargo, estas alteraciones en las características funcionales pueden refinarse adicionalmente y/o manipularse cuando se implementan en el contexto de isotipos de IgG seleccionados. Asimismo, las características nativas del Fc de isotipo pueden manipularse mediante una o más modificaciones de aminoácido. Los múltiples isotipos de IgG (es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) presentan propiedades físicas y funcionales diferentes incluyendo semivida en suero, fijación del complemento, afinidades de unión a FcγR y actividades de función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC) debido a diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus dominios de bisagra y/o Fc. En determinadas realizaciones, la modificación de aminoácidos y la región Fc de IgG se seleccionan independientemente basándose en sus actividades respectivas, de unión y/o función efectora diferentes para diseñar un diacuerpo con características deseadas. En la mayoría de las realizaciones, dichas modificaciones de aminoácido y regiones de bisagra/Fc de IgG se han ensayado por separado para la actividad de unión y/o función efectora tal como se describe en la presente memoria o se sabe en la técnica en el contexto de una IgG1. En determinadas realizaciones, dicha modificación de aminoácidos y región de bisagra/Fc de IgG presentan funcionalidad similar, por ejemplo, afinidad aumentada por FcγRIIA, cuando se ensayan por separado para la unión a FcγR o la función efectora en el contexto de la molécula de diacuerpo u otra molécula que contenga Fc (por ejemplo, una inmunoglobulina). La combinación de dicha modificación de aminoácidos y región Fc de IgG seleccionada, entonces, actúa de forma aditiva o, más preferiblemente, de forma sinérgica para modificar dicha funcionalidad en la molécula de diacuerpo de la divulgación, con respecto a una molécula de diacuerpo de la divulgación que comprende una región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones, dicha modificación de aminoácidos y región Fc de IgG presentan funcionalizadas opuestas, por ejemplo, afinidad aumentada y disminuida, respectivamente, por FcγRIIA, cuando se ensayan por separado para la unión a FcγR y/o función efectora en el contexto de la molécula de diacuerpo u otra molécula que contenga Fc (por ejemplo, una inmunoglobulina) que comprenda una región Fc de tipo silvestre tal como se describe en la presente memoria o se sabe en la técnica; la combinación de dicha modificación de aminoácidos "opuesta" y región de IgG seleccionada entonces actúa atenuando o reduciendo selectivamente una funcionalidad específica en el diacuerpo de la divulgación con respecto a un diacuerpo de la divulgación que no comprende una región Fc o que comprende una región Fc de tipo silvestre del mismo isotipo. Como alternativa, se describen regiones Fc variantes que comprenden combinaciones de modificaciones de aminoácido conocidas en la técnica y regiones de IgG seleccionadas que presentan propiedades novedosas, que son propiedades no detectables cuando dichas modificaciones y/o regiones se ensayaban independientemente tal como se describe en la presente memoria.

Las características funcionales de los múltiples isotipos de IgG, y dominios de los mismos, son bien conocidos en la técnica. Las secuencias de aminoácidos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se presentan en las figuras 1A-1B. La selección y/o combinaciones de dos o más dominios a partir de isotipos de IgG específicos para su uso en los métodos pueden basarse en cualquier parámetro conocido de los isotipos precursores incluyendo la afinidad por FcγR (tabla

7; Flesch *et al.* (2000) "Functions Of The Fc Receptors For Immunoglobulin G," J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel *et al.* (1993) "Identification Of A Secondary Fc Gamma RI Binding Site Within A Genetically Engineered Human IgG Antibody," J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel *et al.* (1991) "Identification Of The Fc Gamma Receptor Class I Binding Site In Human IgG Through The Use Of Recombinant IgG1/IgG2 Hybrid And Point-Mutated Antibodies," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9036-9040). Por ejemplo, el uso de regiones o dominios de isotipos de IgG que presentan unión limitada o ausente a FcγRIIB, por ejemplo, IgG2 o IgG4, puede encontrar uso particular cuando se desea genomanipular un diacuerpo para maximizar la unión a un receptor activador y minimizar la unión a un receptor inhibidor. Asimismo, el uso de regiones o dominios Fc de isotipos de IgG que se sabe que se unen preferentemente a C1q o FcγRIIA, por ejemplo, IgG3 (Brüggemann *et al.* (1987) "Comparison Of The Effector Functions Of Human Immunoglobulins Using A Matched Set Of Chimeric Antibodies," J. Exp. Med. 166:1351-1361), puede combinarse con modificaciones de aminoácido de Fc conocidas en la técnica para potenciar la ADCC, para genomanipular una molécula de diacuerpo de modo que se maximice la actividad de función efectora, por ejemplo, activación del complemento o ADCC.

Tabla 7. Características generales de la unión de IgG a FcγR, adaptada de Flesch y Neppert, 1999, J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156

Receptor	Afinidad estimada por IgG (M^{-1})	Afinidad relativa
FcγRI	$10^8 - 10^9$	IgG3>IgG1>>IgG4 sin unión: IgG2
FcγRIIA R ^{131A}	<10 ⁷	IgG3>IgG1 sin unión: IgG2, IgG4
FcγRIIA H ^{131A}	<10 ⁷	IgG3>IgG1>IgG2 sin unión: IgG4
FcγRIIB ^A	<10 ⁷	IgG3>IgG1>IgG4 sin unión: IgG2
FcγRIII	<10 ⁷	IgG3=IgG1 sin unión: IgG2, IgG4

^A se une solamente a IgG en complejo

5.3 Conjugados moleculares

Las moléculas de diacuerpo de la divulgación pueden fusionarse de forma recombinante o conjugarse químicamente (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) a polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido no relacionado; o parte del mismo, preferiblemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido para generar proteínas de fusión. La fusión no tiene que ser directa necesariamente, pero puede producirse mediante secuencias conectoras.

Además, las moléculas de diacuerpo de la divulgación (es decir, polipéptidos) pueden conjugarse con un agente terapéutico o un resto de fármaco que modifique una respuesta biológica dada. Como alternativa a la conjugación directa, debido a los múltiples sitios de unión a epítopo en las moléculas de diacuerpo multivalentes, por ejemplo, tetravalentes de la divulgación, puede diseñarse al menos una región de unión del diacuerpo para que se una al agente terapéutico o resto de fármaco deseado sin afectar a la unión del diacuerpo.

Los agentes terapéuticos o restos de fármaco no deben interpretarse limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* (es decir, PE-40), o toxina diftérica, ricina, gelonina y proteína antivírica de fitolaca, una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferones incluyendo, aunque sin limitación, interferón-α (IFN-α), interferón-β (IFN-β), factor de crecimiento de nervios (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador de plasminógeno tisular (TPA), un agente apoptótico (por ejemplo, TNF-α, TNF-β, AIM I como se divulga en la publicación PCT n.º WO 97/33899), AIM II (véase, la publicación PCT n.º WO 97/34911), ligando de Fas y VEGF (publicación PCT n.º WO 99/23105), un agente trombótico o un agente antiangiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina), o un modificador de respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfocina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), y factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF"), factor estimulador de colonias de macrófagos, ("M-CSF"), o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento ("GH")); proteasas o ribonucleasas).

Las moléculas de diacuerpo de la divulgación (es decir, polipéptidos) pueden fusionarse a secuencias marcadoras, tal como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, estando muchos de ellos disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz *et al.* (1989) "Bioassay For Trans-Activation Using Purified Human Immunodeficiency Virus TAT-Encoded Protein: Trans-Activation Requires mRNA Synthesis," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824, por ejemplo,

la hexahistidina proporciona purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras marcas peptídicas útiles para la purificación incluyen, aunque sin limitación, la marca de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson *et al.* (1984) "*The Structure Of An Antigenic Determinant In A Protein*," Cell, 37:767-778) y la marca "flag" (Knappik *et al.* (1994) "*An Improved Affinity Tag Based On The FLAG Peptide For The Detection And Purification Of Recombinant Antibody Fragments*," Biotechniques, 17(4):754-761).

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales mediante las técnicas de reorganización génica, reorganización de motivos, reorganización de exones y/o reorganización de codones (colectivamente mencionados como "reorganización de ADN"). La reorganización de ADN puede emplearse para alterar las actividades de moléculas de la divulgación (por ejemplo, sitios de unión a epítipo con mayores afinidades y menores tasas de disociación). Véanse, en general, las patentes de Estados Unidos n.º 5605793; 5811238; 5830721; 5834252; y 5837458, y Patten *et al.* (1997) "*Applications Of DNA Shuffling To Pharmaceuticals And Vaccines*," Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-733; Harayama (1998) "*Artificial Evolution By DNA Shuffling*," Trends Biotechnol. 16:76-82; Hansson *et al.* (1999) "*Evolution Of Differential Substrate Specificities In Mu Class Glutathione Transferases Probed By DNA Shuffling*," J. Mol. Biol. 287:265-276; y Lorenzo *et al.* (1998) "*PCR-Based Method For The Introduction Of Mutations In Genes Cloned And Expressed In Vaccinia Virus*," BioTechniques 24:308-313. Las moléculas de diacuerpo de la divulgación, o los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la divulgación, pueden alterarse además sometiendo a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Puede recombinarse una o más partes de un polinucleótido que codifica una molécula de la divulgación con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogos.

La presente divulgación también abarca moléculas de diacuerpo de la divulgación conjugada con o que reconocen inmuno-específicamente un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para la que se desee aumentar/disminuir la semivida en suero y/o dirigir a un subconjunto particular de células. Las moléculas de la divulgación pueden usarse de forma diagnóstica para, por ejemplo, controlar el desarrollo o progresión de una enfermedad, trastorno o infección como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de una pauta de tratamiento dada. La detección puede verse facilitada por el acoplamiento de las moléculas de la divulgación a una sustancia detectable o por las moléculas que reconocen inmuno-específicamente la sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones y iones de metales paramagnéticos no radioactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente a las moléculas de la divulgación o indirectamente, mediante un intermedio (tal como, por ejemplo, un conector conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica, o la molécula puede reconocer inmuno-específicamente la sustancia detectable: unión inmuno-específica a dicha sustancia. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4741900 para iones de metales que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico. Dicho diagnóstico y detección pueden conseguirse diseñando las moléculas para que reconozcan inmuno-específicamente la sustancia detectable o acoplando las moléculas de la divulgación a sustancias detectables incluyendo, aunque sin limitación, diversas enzimas, enzimas incluyendo, aunque sin limitación, peroxidasa de rábano rústico, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; complejos de grupo prostético tales como, aunque sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, aunque sin limitación, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriacililamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente tal como, aunque sin limitación, luminol; materiales bioluminiscentes tales como, aunque sin limitación, luciferasa, luciferina y aequorina; material radioactivo tal como, aunque sin limitación, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{14}C), cromo (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co), flúor (^{18}F), gadolinio (^{153}Gd , ^{159}Gd), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), lantano (^{140}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodimio (^{142}Pr), promecio (^{149}Pm), renio (^{186}Re , ^{188}Re), rodio (^{105}Rh), rutenio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}Sc), selenio (^{75}Se), estroncio (^{85}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), estaño (^{113}Sn , ^{117}Sn), tritio (^3H), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb , ^{175}Yb), itrio (^{90}Y), cinc (^{65}Zn); metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones de metales paramagnéticos o radioactivos.

Las moléculas de diacuerpo de la divulgación pueden reconocer inmuno-específicamente o conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radioactivo (por ejemplo, emisores alfa, emisores gamma, etc.). Las citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoesteroides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, aunque sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cisdiclorodiamina platino (II) ((DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo,

dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Además, una molécula de diacuerpo de la divulgación puede conjugarse con o diseñarse para que reconozca inmunoespecíficamente restos terapéuticos tales como materiales radioactivos o quelantes macrocíclicos útiles para
 5 conjugar iones radiometálicos (véase anteriormente para los ejemplos de materiales radioactivos). En determinadas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que puede adherirse al polipéptido mediante una molécula conectora. Dichas moléculas conectoras son habitualmente conocidas en la técnica y se describen en Denardo *et al.* (1998) "*Comparison Of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-Tetraacetic Acid (DOTA)-Peptide-ChL6, A Novel Immunoconjugate With Catabolizable Linker, To 2-Iminothiolane-2-[p-(bromoacetamido)benzyl]-DOTA-ChL6 In Breast Cancer Xenografts*," Clin. Cancer Res. 4:2483-2490; Peterson *et al.* (1999) "*Enzymatic Cleavage Of Peptide-Linked Radiolabels From Immunoconjugates*," Bioconjug. Chem. 10:553-; y Zimmerman *et al.*, (1999) "*A Triglycine Linker Improves Tumor Uptake And Biodistributions Of 67-Cu-Labeled Anti-Neuroblastoma mAb chCE7 F(ab')₂ Fragments*," Nucl. Med. Biol. 26:943-950.

Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos con polipéptidos, incluyendo, por ejemplo, dominios Fc, son bien conocidas; véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "*Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy*", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (ed.), 1985, pág. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom *et al.*, "*Antibodies For Drug Delivery*", en *Controlled Drug Delivery* (2.^a Ed.), Robinson *et al.* (ed.), 1987, pág. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "*Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review*", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (ed.), 1985, pág. 475-506); "*Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy*", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (ed.), 1985, pág. 303-16, Academic Press; y Thorpe *et al.* (1982) "*The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates*," Immunol. Rev., 62:119-158.

La molécula de diacuerpo de la divulgación puede administrarse con o sin un resto terapéutico conjugado con la misma, administrarse en solitario o en combinación con uno o más factores citotóxicos y/o una o más citocinas para su uso como tratamiento terapéutico. Cuando se administra en solitario, al menos un epítipo de una molécula de diacuerpo multivalente, por ejemplo, tetravalente, puede diseñarse para que reconozca inmunoespecíficamente un agente terapéutico, por ejemplo, uno o más factores citotóxicos y/o una o más citocinas, que pueden administrarse simultánea o posteriormente a la molécula de la divulgación. De esta manera, la molécula de diacuerpo puede dirigir
 30 específicamente el agente terapéutico de una manera similar a la conjugación directa. Como alternativa, una molécula de la divulgación puede conjugarse con un anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe por Segal en la patente de Estados Unidos n.º 4676980. Las moléculas de diacuerpo de la divulgación también pueden adherirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, aunque sin limitación, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

5.4 Caracterización de la unión de moléculas de diacuerpo

Las moléculas de diacuerpo de la presente divulgación pueden caracterizarse de una diversidad de formas. En particular, las moléculas de la divulgación pueden ensayarse para la capacidad de unirse inmunoespecíficamente a un antígeno, por ejemplo, FcRIIIA o FcRIIB, o, cuando la molécula comprende un dominio Fc (o parte del mismo) para la capacidad de presentar interacciones de Fc-FcγR, es decir, unión específica de un dominio Fc (o parte del mismo) a un FcγR. Dicho ensayo puede realizarse en disolución (por ejemplo, Houghten (1992) "*The Use Of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries For The Identification Of Bioactive Peptides*," BioTechniques, 13:412-421), en microesferas (Lam (1991) "*A New Type Of Synthetic Peptide Library For Identifying Ligand-Binding Activity*," Nature, 354:82-84), en chips (Fodor (1993) "*Multiplexed Biochemical Assays With Biological Chips*," Nature, 364:555-556), en bacterias (patente de Estados Unidos n.º 5223409), en esporas (patentes de Estados Unidos n.º 5571698; 5403484; y 5223409), en plásmidos (Cull *et al.* (1992) "*Screening For Receptor Ligands Using Large Libraries Of Peptides Linked To The C Terminus Of The Lac Repressor*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1865-1869) o en fagos (Scott *et al.* (1990) "*Searching For Peptide Ligands With An Epitope Library*," Science, 249:386-390; Devlin (1990) "*Random Peptide Libraries: A Source Of Specific Protein Binding Molecules*," Science, 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) "*Peptides On Phage: A Vast Library Of Peptides For Identifying Ligands*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382; y Felici (1991) "*Selection Of Antibody Ligands From A Large Library Of Oligopeptides Expressed On A Multivalent Exposition Vector*," J. Mol. Biol., 222:301-310). Las moléculas que se ha identificado que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno, por ejemplo, FcγRIIIA, entonces pueden ensayarse para su especificidad y afinidad por el antígeno.

Las moléculas de la divulgación que se han genomaniplado para que comprendan múltiples dominios de unión a epítipo pueden ensayarse para la unión inmunoespecífica a uno o más antígenos (por ejemplo, antígeno canceroso y reactividad cruzada con otros antígenos (por ejemplo, FcγR)) o, cuando las moléculas comprenden un dominio Fc (o parte del mismo) para interacciones de Fc-FcγR por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión inmunoespecífica, la reactividad cruzada y las interacciones de Fc-FcγR incluyen, aunque sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como

transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmuoadsorción enzimática), inmunoensayos "emparedados", ensayos de inmunoprecipitación, reacción de precipitina, reacción de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar solo unos pocos. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, ed, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

La afinidad de unión y la disociación de la interacción del antígeno y el dominio de unión o la interacción de Fc-FcγR pueden determinarse por ensayos de unión competitivos. Un ejemplo de un ensayo de unión competitivo es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno marcado, tal como FcγR tetramérico (por ejemplo, ³H o ¹²⁵I, véase la sección 5.4.1) con una molécula de interés (por ejemplo, moléculas de la presente divulgación que comprenden múltiples dominios de unión a epítipo en presencia de cantidades crecientes de epítipo no marcado, tal como FcγR tetramérico (véase la sección 5.4.1), y la detección de la molécula unida al antígeno marcado. La afinidad de la molécula de la presente divulgación por un antígeno y la disociación de unión pueden determinarse a partir de los datos de saturación por análisis de Scatchard.

Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas de la divulgación por un antígeno o FcγR pueden determinarse inicialmente usando ensayos *in vitro* (ensayos de base bioquímica o inmunológica) conocidos en la técnica para las interacciones del antígeno y el dominio de unión o de Fc-FcγR, incluyendo, aunque sin limitación, ensayo de ELISA, ensayos de resonancia de plasmones superficiales, ensayos de inmunoprecipitación. Preferiblemente, las propiedades de unión de las moléculas de la divulgación también se caracterizan por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones celulares efectoras mediadoras de FcγR, como se describe en la sección 5.4.2. En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la divulgación tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tales como los descritos y divulgados en la presente memoria) como aquellas en ensayos de base *in vitro*. Sin embargo, la presente divulgación no excluye moléculas de la divulgación que no muestren el fenotipo deseado en ensayos de base *in vitro*, pero muestren el fenotipo deseado *in vivo*.

En algunas realizaciones, el cribado y la identificación de moléculas que comprenden múltiples dominios de unión a epítipo y, opcionalmente, dominios Fc (o partes de los mismos) se hacen en ensayos de base funcional, preferiblemente en de una manera de alto rendimiento. Los ensayos de base funcional pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones celulares efectoras mediadas por FcγR tales como las descritas en la presente memoria en las secciones 5.4.2 y 5.4.3. Ejemplos no limitantes de funciones celulares efectoras que pueden usarse de acuerdo con los métodos descritos incluyen, aunque sin limitación, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento.

En una realización preferida, se usa análisis cinético BIAcore para determinar la unión y disociación de moléculas de la presente divulgación a un antígeno y/o FcγR. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y disociación de un antígeno o FcγR de chips con moléculas inmovilizadas (por ejemplo, moléculas que comprenden dominios de unión a epítipo o dominios Fc (o partes de los mismos), respectivamente) en su superficie. El análisis BIAcore se describe en la sección 5.4.3.

Preferiblemente, la clasificación celular actividad por fluorescencia (FACS), usando cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la materia, se usa para ensayos de base inmunológica o funcional para caracterizar moléculas de la divulgación. Los clasificadores de flujo pueden examinar rápidamente una gran cantidad de células individuales que pueden haberse unido, por ejemplo, opsonizado, por las moléculas de la divulgación (por ejemplo, 10-100 millones de células por hora) (Shapiro *et al.* (1995) Practical Flow Cytometry). Adicionalmente, parámetros específicos usados para la optimización del comportamiento del diacuerpo incluyen, aunque sin limitación, la concentración del antígeno (es decir, el complejo tetramérico de FcγR, véase la sección 5.4.1), el tiempo de competición cinética o la rigurosidad de FACS, que pueden variarse cada uno de ellos para seleccionar las moléculas de diacuerpos que comprendan moléculas de la divulgación que presenten propiedades de unión específicas, por ejemplo, unión simultánea a múltiples epítopos. Los citómetros de flujo para clasificar y examinar células biológicas son bien conocidos en la técnica. Se describen citómetros de flujo conocidos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 4347935; 5464581; 5483469; 5602039; 5643796; y 6211477. Otros citómetros de flujo conocidos son el sistema FACS Vantage™ fabricado por Becton Dickinson and Company, y el sistema COPAS™ fabricado por Union Biometrica.

La caracterización de la afinidad de unión a antígeno diana o afinidad de unión de Fc-FcγR, y la evaluación de la densidad del antígeno diana o FcγR en una superficie celular puede hacerse por métodos bien conocidos en la técnica, tales como análisis de Scatchard o mediante el uso de kits según las instrucciones del fabricante, tal como Quantum™ Simply Cellular® (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). El uno o más ensayos funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones celulares efectoras mediadas por FcγR como saben los expertos en la materia o se describe en la presente memoria. Las moléculas descritas en la presente memoria que comprenden múltiples dominios de unión a epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo) se ensayan en un ensayo ELISA para la unión a uno o más antígenos diana o uno o más FcγR, por

ejemplo, FcγRIIIA, FcγRIIA, FcγRIIB; seguido de uno o más ensayos de ADCC. En algunas realizaciones, las moléculas de la divulgación se ensayan además usando un ensayo basado en resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, BIAcore. Los ensayos basados en resonancia de plasmones superficiales son bien conocidos en la técnica, y se analizan además en la sección 5.4.3, y se ejemplifican en la presente memoria, por ejemplo, en el ejemplo 6.1.

En realizaciones mucho más preferidas, las moléculas de la invención que comprenden múltiples dominios de unión a epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo) se caracterizan además en un modelo animal para la interacción con un antígeno diana (por ejemplo, un FcγR) o para la interacción de Fc-FcγR. Cuando tienen que evaluarse interacciones de Fc-FcγR, los modelos animales preferidos para su uso en los métodos son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγR humanos, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5877397 y 6676927. Ratones transgénicos adicionales para su uso en dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, ratones atímicos con inactivación de FcγRIIIA que portan FcγRIIIA humano; ratones atímicos con inactivación de FcγRIIIA que portan FcγRIIA humano; ratones atímicos con inactivación de FcγRIIIA que portan FcγRIIB humano y FcγRIIIA humano; ratones atímicos con inactivación de FcγRIIIA y FcγRIIA que portan FcγRIIIA y FcγRIIA humano y ratones atímicos con inactivación de FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB que portan FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB humano.

5.4.1 Ensayos de unión que comprenden FcγR

La caracterización de la unión a FcγR por moléculas que comprenden un dominio Fc (o parte del mismo) y/o que comprenden dominio de unión a epítipo específico para un FcγR puede hacerse usando cualquier FcγR, incluyendo, aunque sin limitación, variantes polimórficas de FcγR. En algunas realizaciones, se usa una variante polimórfica de FcγRIIIA, que contiene una fenilalanina en la posición 158. En otras realizaciones, la caracterización se hace usando una variante polimórfica de FcγRIIIA que contiene una valina en la posición 158. FcγRIIIA 158V presenta una mayor afinidad por IgG1 que 158F y una actividad ADCC aumentada (véase, por ejemplo, Koene *et al.* (1997) "*Fc gammaRIIIA-158V/F Polymorphism Influences The Binding Of IgG By Natural Killer Cell Fc gammaRIIIA, Independently Of The Fc gammaRIIIA-48L/R/H Phenotype*," Blood, 90:1109-14; Wu *et al.* (1997) "*A Novel Polymorphism Of Fc gammaRIIIA (CD16) Alters Receptor Function And Predisposes To Autoimmune Disease*," J. Clin. Invest. 100: 1059-70; este resto, de hecho, interactúa directamente con la región de bisagra inferior de IgG1 como se muestra recientemente por los estudios de cocrystalización de IgG1-FcγRIIIA, véase, por ejemplo, Sondermann *et al.* (2000) "*The 3.2-A Crystal Structure Of The Human IgG1 Fc Fragment-Fc gammaRIII complex*," Nature, 406(6793):267-273. Los estudios han demostrado que, en algunos casos, los anticuerpos terapéuticos tienen eficacia mejorada en paciente homocigóticos para FcγRIIIA-158V. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD20 Rituximab era terapéuticamente más eficaz en pacientes homocigóticos para FcγRIIIA-158V en comparación con pacientes homocigóticos para FcγRIIIA 158F (véase, por ejemplo, Cartron *et al.* (2002) "*Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In IgG Fc Receptor Fc gammaRIIIA Gene*," Blood, 99(3): 754-758). En otras realizaciones, moléculas terapéuticas que comprenden esta región también pueden ser más eficaces en pacientes heterocigóticos para FcγRIIIA-158V y FcγRIIIA-158F, y en pacientes con FcγRIIIA-131H. Aunque no se pretende limitarse a un mecanismo de acción particular, la selección de moléculas de la divulgación con alotipos alternativos puede proporcionar variantes que, una vez genomanipuladas en diacuerpos terapéuticos, serán clínicamente más eficaces para pacientes homocigóticos para dicho alotipo.

Se desarrollo un ensayo de unión de FcγR para determinar la unión de las moléculas de la divulgación a FcγR y, en particular, para determinar la unión de dominios Fc a FcγR. El ensayo permitió la detección y cuantificación de interacciones de Fc-FcγR, a pesar de la afinidad inherentemente débil del receptor por su ligando, por ejemplo, en el intervalo micromolar para FcγRIIB y FcγRIIIA. El método se describe en detalle en la solicitud internacional WO 04/063351 y las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos 2005/0037000 y 2005/0064514. En resumen, el método implica la formación de un complejo de FcγR que pueda usarse en cualquier inmunoensayo convencional conocido en la técnica, por ejemplo, FACS, ELISA, resonancia de plasmones superficiales, etc. Adicionalmente, el complejo de FcγR tiene una avidéz mejorada por una región Fc, con respecto a un FcγR que no está en complejo. De acuerdo con la divulgación, el complejo molecular preferido es un complejo inmunitario tetramérico, que comprende: (a) la región soluble de FcγR (por ejemplo, la región soluble de FcγRIIIA, FcγRIIA o FcγRIIB); (b) una secuencia AVITAG de 15 aminoácidos biotinilada (AVITAG) unida de forma funcional al extremo C de la región soluble de FcγR (por ejemplo, la región soluble de FcγRIIIA, FcγRIIA o FcγRIIB); y (c) estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE); en una relación molar para formar un complejo de FcγR tetramérico (preferiblemente en una relación molar de 5:1). La proteína de fusión se biotinila enzimáticamente usando, por ejemplo, la enzima Bir A de *E. coli*, una biotina ligasa que biotinila específicamente un resto de lisina en la secuencia AVITAG de 15 aminoácidos. Las proteínas FcγR solubles biotiniladas entonces se mezclan con SA-PE en una relación molar de SA-PE 1X:FcγR soluble biotinilado 5X para formar un complejo de FcγR tetramérico.

Se ha demostrado que polipéptidos que comprenden regiones Fc se unen a complejos de FcγR tetraméricos con al menos una afinidad 8 veces mayor que el FcγR monomérico que no está en complejo. La unión de los polipéptidos que comprenden regiones Fc a los complejos de FcγR tetraméricos puede determinarse usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayos, ensayos ELISA, etc.

También se describe el uso de los complejos inmunitarios que comprenden moléculas de la divulgación, y se forman de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, para determinar la funcionalidad de moléculas que comprenden una región Fc en ensayos basados en células o sin células.

- 5 Por cuestiones de conveniencia, los reactivos pueden proporcionarse en un kit de ensayo, es decir, una combinación de reactivos envasados para ensayar la capacidad de moléculas que comprenden regiones Fc de unirse a complejos de FcγR tetraméricos. También se contemplan otras formas de complejos moleculares para su uso en la determinación de interacciones de Fc-FcγR para su uso en los métodos, por ejemplo, proteínas de fusión.

5.4.2 Ensayos funcionales de moléculas con cadenas pesadas variantes

- 10 También se describe la caracterización de las moléculas descritas en la presente memoria que comprenden múltiples dominios de unión a epítipo y, opcionalmente, dominios Fc (o partes de los mismos) usando ensayos conocidos para los expertos en la materia para identificar la función celular efectora de las moléculas. También se describe la caracterización de las moléculas de la divulgación para la función celular efectora mediada por FcγR. Adicionalmente, cuando al menos uno de los antígenos diana de la molécula de diacuerpo de la divulgación es un FcγR, la unión del FcγR por la molécula de diacuerpo puede servir para activar las rutas mediadas por FcγR similares a las activadas por la unión de FcγR-Fc. Por tanto, cuando al menos un dominio de unión a epítipo de la molécula de diacuerpo reconoce un FcγR, la molécula de diacuerpo puede provocar la función celular efectora mediada por FcγR sin que contenga un dominio Fc (o parte del mismo), o sin unión concomitante de Fc-FcγR. Ejemplos de funciones celulares efectoras que pueden ensayarse incluyen, aunque sin limitación, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento. Puede usarse cualquier ensayo basado en células o sin células conocido por los expertos en la materia para determinar la actividad de función celular efectora (para ensayos de células efectoras, véase Perussia *et al.* (2000) "Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC (Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells," Methods Mol. Biol. 121: 179-92; Baggiolini *et al.* (1988) "Cellular Models For The Detection And Evaluation Of Drugs That Modulate Human Phagocyte Activity," Experientia, 44(10): 841-848; Lehmann *et al.* (2000) "Phagocytosis: Measurement By Flow Cytometry," J. Immunol. Methods, 243(1-2): 229-42; Brown (1994) "In Vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction," Methods Cell Biol., 45: 147-64; Munn *et al.* (1990) "Phagocytosis Of Tumor Cells By Human Monocytes Cultured In Recombinant Macrophage Colony-Stimulating Factor," J. Exp. Med., 172: 231-237; Abdul-Majid *et al.* (2002) "Fc Receptors Are Critical For Autoimmune Inflammatory Damage To The Central Nervous System In Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," Scand. J. Immunol. 55: 70-81; Ding *et al.* (1998) "Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids," Immunity 8:403-411).
- 25
- 30

- En una realización, las moléculas de la divulgación pueden ensayarse para la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos humanos. Como alternativa, la fagocitosis mediada por FcγR de las moléculas de la divulgación puede ensayarse en otros fagocitos, por ejemplo, neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN); monocitos de sangre periférica humana, macrófagos derivados de monocitos, que pueden obtenerse usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, véase Brown (1994) "In Vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction," Methods Cell Biol., 45: 147-164). En una realización, la función de las moléculas de la divulgación se caracteriza midiendo la capacidad de las células THP-1 de fagocitar glóbulos rojos de oveja (SRBC) opsonizados con IgG marcados con fluoresceína por métodos descritos previamente (Tridandapani *et al.* (2000) "The Adapter Protein LAT Enhances Fcγ Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells," J. Biol. Chem. 275: 20480-20487).
- 35
- 40

- Otro ensayo ejemplar para determinar la fagocitosis de las moléculas de la divulgación es un ensayo de opsonofagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP) que puede comprender lo siguiente: recubrir una biopartícula diana tal como *Escherichia coli*-FITC marcada (Molecular Probes) o *Staphylococcus aureus*-FITC con (i) anticuerpo 4-4-20 de tipo silvestre, un anticuerpo contra fluoresceína (véase Bedzyk *et al.* (1989) "Comparison Of Variable Region Primary Structures Within An Anti-Fluorescein Idiotype Family," J. Biol. Chem, 264(3): 1565-1569), como anticuerpo de control para ADCP dependiente de FcγR; o (ii) anticuerpo 4-4-20 que alberga la mutación D265A que inactiva la unión a FcγRIII, como control de fondo para ADCP dependiente de FcγR; (iii) un diacuerpo que comprenden el dominio de unión a epítipo de 4-4-20 y un dominio Fc y/o un dominio de unión a epítipo específico para FcγRIII; y formar la partícula opsonizada; añadir cualquiera de las partículas opsonizadas descritas (i-iii) a células efectoras THP-1 (una línea celular monocítica disponible en la ATCC) a una relación de 1:1, 10:1, 30:1, 60:1, 75:1 o 100:1 para permitir que se produzca la fagocitosis mediada por FcγR; preferiblemente incubar las células y *E. coli*-FITC/anticuerpo a 37 °C durante 1,5 horas; añadir azul tripano después de incubación (preferiblemente a temperatura ambiente durante 2-3 min.) a las células para inactivar la fluorescencia de las bacterias que se adhieren al exterior de la superficie celular sin internalizarse; transferir las células a un tampón de FACS (por ejemplo, 0,1 %, BSA en PBS, 0,1 %, azida de sodio), analizar la fluorescencia de las células THP1 usando FACS (por ejemplo, BD FACS Calibur). Preferiblemente, las células THP-1 usadas en el ensayo se analizan por FACS para la expresión de FcγR en la superficie celular. Las células THP-1 expresan tanto CD32A como CD64. CD64 es un FcγR de alta afinidad que se bloquea al realizar el ensayo de ADCP de acuerdo con los métodos de la presente memoria. Las células THP-1 se bloquean preferiblemente con 100 µg/ml de IgG1 soluble o suero humano
- 45
- 50
- 55
- 60

al 10 %. Para analizar el grado de ADCP, la ventana de adquisición se establece preferiblemente en células THP-1 y se mide la mediana de la intensidad de fluorescencia. La actividad ADCP para mutantes individuales se calcula y se presenta como un valor normalizado al chMab 4-4-20 de tipo silvestre obtenido. Las partículas opsonizadas se añaden a células THP-1 de modo que la relación de las partículas opsonizadas a las células THP-1 sea de 30:1 o 60:1. En realizaciones mucho más preferidas, el ensayo de ADCP se realiza con controles, tales como *E. coli*-FITC en medio, *E. coli*-FITC y células THP-1 (que sirve como actividad ADCP independiente de FcγR), *E. coli*-FITC, células THP-1 y anticuerpo 4-4-20 de tipo silvestre (que sirve como actividad ADCP dependiente de FcγR), *E. coli*-FITC, células THP-1, 4-4-20 D265A (que sirve como control de fondo para la actividad ADCP dependiente de FcγR).

En otra realización, las moléculas de la divulgación pueden ensayarse para la actividad ADCC mediada por FcγR en células efectoras, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales, usando cualquiera de los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Perussia *et al.* (2000) "Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC (Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells," *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92; Weng *et al.* (2003) "Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma," *J. Clin. Oncol.* 21:3940-3947; Ding *et al.* (1998) "Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids," *Immunity* 8:403-411). Un ensayo ejemplar para determinar la actividad ADCC de las moléculas de la divulgación se basa en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr que comprende: marcar células diana con [⁵¹Cr]Na₂CrO₄ (esta molécula filtrable en la membrana celular se usa habitualmente para marcaje, ya que se une a proteínas citoplásmicas y, aunque se libera espontáneamente de las células con cinética lenta, se libera masivamente después de necrosis de la célula diana); opsonizar las células diana con las moléculas de la divulgación que comprenden cadenas pesadas variantes; combinar las células diana radiomarcadas opsonizadas con células efectoras en una placa de microvaloración a una relación apropiada de células diana a células efectoras; incubar la mezcla de células durante 16-18 horas a 37 °C; recoger los sobrenadantes; y analizar la radioactividad. La citotoxicidad de las moléculas de la divulgación entonces puede determinarse, por ejemplo, usando la siguiente fórmula: % de lisis = (cpm experimentales - cpm de la filtración de la diana)/(cpm de la lisis con detergente - cpm de la filtración de la diana) x 100 %. Como alternativa, % de lisis = (ADCC-AICC)/(liberación máxima - liberación espontánea). La lisis específica puede calcularse usando la fórmula: lisis específica = % de lisis con las moléculas de la divulgación - % de lisis en ausencia de las moléculas de la divulgación. Puede generarse un gráfico variando la relación de diana:célula efectora o la concentración de anticuerpo.

Preferiblemente, las células efectoras usadas en los ensayos de ADCC son leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se purifican preferiblemente de sangre humana normal, usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, usando centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque. Las células efectoras preferidas para su uso en los métodos expresan diferentes receptores activadores FcγR. También se describen células efectoras, THP-1, que expresan FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIB, y macrófagos primarios derivados de monocitos derivados de sangre humana completa que expresan tanto FcγRIIA como FcγRIIB, para determinar si mutantes de anticuerpo de cadena pesada muestran actividad ADCC aumentada y fagocitosis con respecto a anticuerpos IgG1 de tipo silvestre.

La línea celular de monocitos humanos, THP-1, activa la fagocitosis mediante la expresión del receptor de alta afinidad FcγRI y el receptor de baja afinidad FcγRIIA (Fleit *et al.* (1991) "The Human Monocyte-Like Cell Line THP-1 Expresses FcγRI And FcγRIIA," *J. Leuk. Biol.* 49: 556-565). Las células THP-1 no expresan de forma constitutiva FcγRIIA o FcγRIIB. La estimulación de estas células con citocinas afecta al patrón de expresión de FcγR (Pricop *et al.* (2001) "Differential Modulation Of Stimulatory And Inhibitory Fcγ Receptors On Human Monocytes By Th1 And Th2 Cytokines," *J. of Immunol.*, 166: 531-537). El crecimiento de células THP-1 en presencia de la citocina IL4 induce la expresión de FcγRIIB y también causa una reducción en la expresión de FcγRIIA y FcγRI. La expresión de FcγRIIB también puede potenciarse mediante una densidad celular aumentada (Tridandapani *et al.* (2002) "Regulated Expression And Inhibitory Function Of FcγRIIB In Human Monocytic Cells," *J. Biol. Chem.*, 277(7): 5082-5089). Por el contrario, se ha informado de que IFNγ puede dar lugar a la expresión de FcγRIIA (Pearse *et al.* (1993) "Interferon Gamma-Induced Transcription Of The High-Affinity Fcγ Receptor For IgG Requires Assembly Of A Complex That Includes The 91-kDa Subunit Of Transcription Factor ISGF3," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 4314-4318). La presencia o ausencia de receptores en la superficie celular puede determinarse por FACS usando métodos comunes conocidos por los expertos en la materia. La expresión inducida por citocinas de FcγR en la superficie celular proporciona un sistema para ensayar tanto la activación como la inhibición en presencia de FcγRIIB. Si las células THP-1 no puede expresar el FcγRIIB, puede usarse otra línea celular de monocitos humanos, U937. Se ha demostrado que estas células se diferencian de forma terminal en macrófagos en presencia de IFNγ y TNF (Koren *et al.* (1979) "In Vitro Activation Of A Human Macrophage-Like Cell Line," *Nature* 279: 328-331).

La eliminación de células tumorales dependiente de FcγR está mediada por macrófagos y linfocitos NK en modelos de tumor de ratón (Clynes *et al.* (1998) "Fc Receptors Are Required In Passive And Active Immunity To Melanoma," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 652-656). También se describe el uso de monocitos sedimentados de donadores como células efectoras para analizar la eficacia de mutantes de Fc en activar la citotoxicidad celular de las células diana tanto en ensayos de fagocitosis como de ADCC. Los patrones de expresión de FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIB se

ven afectados por diferentes condiciones de crecimiento. La expresión de FcγR a partir de monocitos sedimentados congelados, monocitos sedimentados frescos, monocitos mantenidos en FBS al 10 % y monocitos cultivados en FBS + GM-CSF y/o en suero humano, puede determinarse usando métodos habituales conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las células pueden teñirse con anticuerpos específicos para FcγR y analizarse por FACS para determinar los perfiles de FcR. Las condiciones que imitan mejor la expresión de FcγR *in vivo* en macrófagos se usa entonces para los métodos de la presente memoria.

También se describe el uso de células de ratón especialmente cuando no se pueden obtener células humanas con los perfiles de FcγR correctos. También se describe la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7 (ATCC) que puede transfectarse con FcγRIIIA humano y los transfectantes estables pueden aislarse usando métodos conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Ralph *et al.* (1977) "*Antibody-Dependent Killing Of Erythrocyte And Tumor Targets By Macrophage-Related Cell Lines: Enhancement By PPD And LPS*," J. Immunol. 119: 950-4). Los transfectantes pueden cuantificarse para la expresión de FcγRIIIA mediante análisis FACS usando experimentación rutinaria y pueden usarse agentes de alta expresión en los ensayos de ADCC. También se describe el aislamiento de macrófagos peritoneales del bazo que expresan FcγR humano a partir de ratones transgénicos de inactivación tales como los divulgados en la presente memoria.

Los linfocitos pueden recogerse de sangre periférica de donadores (PBM) usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Dentro de la población mononuclear aislada de células, la mayoría de la actividad ADCC se produce mediante linfocitos citolíticos naturales (NK) que contienen FcγRIIIA, pero no FcγRIIB en su superficie. Los resultados con estas células indican la eficacia de los mutantes en la activación de ADCC por linfocitos NK y establecen los reactivos para ensayo con monocitos sedimentados.

Las células diana usadas en los ensayos de ADCC incluyen, aunque sin limitación, líneas celulares de cáncer de mama, por ejemplo, SK-BR-3 con el número de acceso a la ATCC HTB-30 (véase, por ejemplo, Tremp *et al.* (1976) "*Human Breast Cancer In Culture*," Recent Results Cancer Res. 33-41); linfocitos B; células derivadas de linfoma de Burkitt, por ejemplo, células Raji con el número de acceso a la ATCC CCL-86 (véase, por ejemplo, Epstein *et al.* (1965) "*Characteristics And Mode Of Growth Of Tissue Culture Strain (EB1) Of Human Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma*," J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-240), y células Daudi con el número de acceso a la ATCC CCL-213 (véase, por ejemplo, Klein *et al.* (1968) "*Surface IgM-Kappa Specificity On A Burkitt Lymphoma Cell In Vivo And In Derived Culture Lines*," Cancer Res. 28: 1300-1310). Las células diana deben reconocerse por el sitio de unión a antígeno de la molécula de diacuerpo a ensayar.

El ensayo de ADCC se basa en la capacidad de los linfocitos NK de mediar la muerte celular mediante una ruta apoptótica. Los linfocitos NK median la muerte celular, en parte, mediante el reconocimiento por FcγRIIIA de un dominio Fc de IgG unido a un antígeno en una superficie celular. Los ensayos de ADCC usados de acuerdo con los métodos de la presente memoria pueden ser ensayos de basados en radioactividad o ensayos basados en fluorescencia. El ensayo de ADCC usado para caracterizar las moléculas descritas en la presente memoria, que comprenden regiones Fc variantes comprende marcar las células diana, por ejemplo, SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, células Daudi, opsonizar las células diana con un anticuerpo que reconozca un receptor de superficie celular en la célula diana mediante su sitio de unión a antígeno; combinar las células diana opsonizadas marcadas y las células efectoras a una relación apropiada, que puede determinarse por experimentación rutinaria; recoger las células; detectar el marcador en el sobrenadante de las células diana lisadas, usando un esquema de detección apropiado basado en el marcador usado. Las células diana pueden marcarse con un marcador radioactivo o un marcador fluorescente, usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, los marcadores incluyen, aunque sin limitación, [⁵¹Cr]Na₂CrO₄; y el éster acetoximetílico del ligando potenciador de la fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridina-6-6"-dicarboxilato (TDA).

En una realización preferida específica, se usa un ensayo fluorimétrico con resolución temporal para medir la actividad ADCC contra las células diana que se han marcado con el éster acetoximetílico del ligando potenciador de la fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridina-6-6"-dicarboxilato (TDA). Dichos ensayos fluorimétricos son conocidos en la técnica, por ejemplo, véase, Blomberg *et al.* (1996) "*Time-Resolved Fluorometric Assay For Natural Killer Activity Using Target Cells Labelled With A Fluorescence Enhancing Ligand*," Journal of Immunological Methods, 193: 199-206. En resumen, las células diana se marcan con el diéster acetoximetílico de TDA (2,2':6',2"-terpiridina-6-6"-dicarboxilato de bis(acetoximetilo), (BATDA)) filtrable en la membrana, que difunde rápidamente a través de la membrana celular de células viables. Las esterases intracelulares separan los grupos éster y la molécula TDA impermeable en la membrana regenerada se atrapa en el interior de la célula. Después de incubación de las células efectoras y diana, por ejemplo, durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37 °C, en CO₂ al 5 %, el TDA liberado de las células diana lisadas se quela con Eu³⁺ y la fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados se cuantifica en un fluorímetro de resolución temporal (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallace).

En otra realización específica, el ensayo de ADCC usado para caracterizar las moléculas de la divulgación que comprenden múltiples sitios de unión a epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo) comprende las siguientes etapas: Preferiblemente, se marcan 4-5 x 10⁶ células diana (por ejemplo, SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, células Raji) con 2,2':6',2"-terpiridina-t-6"-dicarboxilato de bis(acetoximetilo) (reactivo BATDA DELFIA, Perkin Elmer/Wallac). Para la eficacia de marcaje óptima, el número de células diana usadas en el ensayo de ADCC

preferiblemente no debe exceder de 5×10^6 . El reactivo BATDA se añade a las células y la mezcla se incuba a 37 °C preferiblemente en CO₂ al 5 %, durante al menos 30 minutos. Las células entonces se lavan con un tampón fisiológico, por ejemplo, PBS con sulfinpirazol 0,125 mM, y medio que contiene sulfinpirazol 0,125 mM. Las células diana marcadas entonces se opsonizan (recubren) con una molécula de la divulgación que comprende un dominio de unión a epítipo específico para FcγRIIA y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo). En realizaciones preferidas, la molécula usada en el ensayo de ADCC también es específico para un receptor de superficie celular, un antígeno tumoral o un antígeno canceroso. La molécula de diacuerpo de la invención puede unirse específicamente a cualquier antígeno canceroso o tumoral, tales como los enumerados en la sección 5.6.1. Las células diana en el ensayo de ADCC se eligen de acuerdo con los sitios de unión a epítipo genomanipulados en el diacuerpo de la divulgación, de modo que el diacuerpo se una a un receptor de superficie celular de la célula diana específicamente.

Las células diana se añaden a células efectoras, por ejemplo, PBMC, para producir relaciones de efector:diana de aproximadamente 1:1, 10:1, 30:1, 50:1, 75:1 o 100:1. Las células efectoras y diana se incuban durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37 °C, en CO₂ al 5 %. Los sobrenadantes celulares se recogen y se añaden a una disolución ácida de europio (por ejemplo, solución de europio DELFIA, Perkin Elmer/Wallac). La fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados se cuantifica en un fluorímetro de resolución temporal (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac). Se determina la liberación máxima (MR) y la liberación espontánea (SR) por incubación de células diana con TX-100 al 1 % y medio en solitario, respectivamente. La citotoxicidad celular independiente de anticuerpos (AICC) se mide por incubación de células diana y efectoras en ausencia de una molécula de ensayo, por ejemplo, diacuerpo de la divulgación. Cada ensayo se realiza preferiblemente por triplicado. Se calcula el porcentaje medio de lisis específica como: Liberación experimental (ADCC) - AICC)/(MR-SR) x 100.

También se describen ensayos conocidos en la técnica, y ejemplificados en la presente memoria, para caracterizar la unión a C1q y la mediación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) por moléculas de la divulgación que comprenden dominios Fc (o partes de los mismos). Para determinar la unión a C1q, puede realizarse un ELISA de unión a C1q. Un ensayo ejemplar puede comprender los siguientes: puede recubrirse placas de ensayo durante una noche a 4 °C con polipéptido que comprende una molécula de la divulgación o polipéptido de partida (control) en tampón de recubrimiento. Las placas entonces se lavan y se bloquean. Después del lavado, puede añadirse una alícuota de C1q humano a cada pocillo y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de un lavado adicional, pueden añadirse 100 ul de un anticuerpo de cabra anti-C1q del complemento conjugado con peroxidasa a cada pocillo y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa puede lavarse de nuevo con tampón de lavado y pueden añadirse 100 ul de tampón de sustrato que contiene OPD (dihidrocloreto de O-fenilendiamina (Sigma)) a cada pocillo. La reacción de oxidación, observada por la aparición de un color amarillo, puede dejarse proseguir durante 30 minutos y detenerse mediante la adición de 100 ul de H₂SO₄ 4,5 N. La absorbancia entonces puede leerse a (492-405) nm.

Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.* (1997) "A Non-Radioactive Complement-Dependent Cytotoxicity Assay For Anti-CD20 Monoclonal Antibody," J. Immunol. Methods 202:163-171. En resumen, pueden diluirse diversas concentraciones de la molécula que comprende un dominio Fc (variante) (o parte del mismo) y complemento humano con tampón. Las células que expresan el antígeno al que se une la molécula de diacuerpo pueden diluirse hasta una densidad de aproximadamente 1×10^6 células/ml. Pueden añadirse mezclas de las moléculas de diacuerpo que comprenden un dominio Fc (variante) (o parte del mismo), complemento humano diluido y células que expresan el antígeno a una placa de 96 pocillos de cultivo tisular de fondo plano y se deja incubar durante 2 horas a 37 °C y CO₂ al 5 % para facilitar la lisis celular mediada por el complemento. Entonces pueden añadirse 50 ul de azul alamar (Accumed International) a cada pocillo y se incuba durante una noche a 37 °C. La absorbancia se mide usando un fluorímetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados pueden expresarse en unidades de fluorescencia relativas (UFR). Las concentraciones de muestra pueden calcularse a partir de una curva patrón y el porcentaje de actividad en comparación con molécula no variante, es decir, una molécula que no comprende un dominio Fc o que comprende un dominio Fc no variante, se presenta para la variante de interés.

5.4.3. Otros ensayos

Las moléculas de la divulgación que comprenden múltiples dominios de unión a epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc, pueden ensayarse usando cualquier ensayo basado en resonancia de plasmones superficiales conocido en la técnica para la caracterización de los parámetros cinéticos de la unión antígeno-dominio de unión o Fc-FcγR. Puede usarse cualquier instrumento de SPR disponible en el mercado incluyendo, aunque sin limitación, BIAcore Instruments, disponible en Biacore AB (Uppsala, Suecia); IAsys instruments disponible en Affinity Sensors (Franklin, MA.); el sistema IBIS disponible en Windsor Scientific Limited (Berks, R.U.), los sistemas SPR-CELLIA disponibles en Nippon Laser y en Electronics Lab (Hokkaido, Japón), y el SPR Detector Spreeta disponible en Texas Instruments (Dallas, TX). Para una revisión de la tecnología basada en SPR, véase Mullet *et al.*, (2000) "Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays," Methods 22: 77-91; Dong *et al.*, (2002), "Some new aspects in biosensors," Review in Mol. Biotech., 82: 303-23; Fivash *et al.*, (1998), "BIAcore For Macromolecular Interaction," Current Opinión in Biotechnology 9: 97-101; Rich *et al.*, (2000), "Advances In Surface Plasmon Resonance Biosensor Analysis," Current Opinión in Biotechnology 11: 54-61. Adicionalmente, en los métodos de la presente

memoria se contemplan cualquiera de los instrumentos de SPR y de los métodos basados en SPR para la medición de las interacciones de proteína-proteína descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 6373577; 6289286; 5322798; 5341215; 6268125.

En resumen, los ensayos basados en SPR implican la inmovilización de un miembro de un par de unión en una superficie y el control de su interacción con el otro miembro del par de unión en disolución en tiempo real. La SPR se basa en la medición del cambio en el índice de refracción del disolvente cerca de la superficie que se produce tras la formación o la disociación del complejo. La superficie sobre la que se produce la inmovilización es el chip sensor, que es el corazón de la tecnología de SPR; consiste en una superficie de vidrio recubierta con una fina capa de oro y forma la base de un abanico de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de una molécula a la superficie. En el mercado hay disponibles una diversidad de chips sensores, especialmente en las empresas indicadas *supra*, pudiendo usarse todos ellos en los métodos de la presente memoria. Algunos ejemplos de chips sensores incluyen los disponibles en BIAcore AB, Inc., por ejemplo, Sensor Chip CM5, SA, NTA y HPA. Una molécula de la divulgación se puede inmovilizar en la superficie de un chip sensor usando cualquiera de los métodos y las químicas de inmovilización conocidos en la técnica, que incluyen, aunque sin limitación, un acoplamiento covalente directo a través de grupos amino, un acoplamiento covalente directo a través de grupos sulfhidrilo, la unión de biotina a una superficie recubierta con avidina, el acoplamiento de un aldehído a grupos carbohidrato y la unión a través de la marca de histidina con chips NTA.

En algunas realizaciones, los parámetros cinéticos de la unión de las moléculas de la divulgación que comprenden múltiples sitios de unión a epítipo y, opcionalmente y dominio Fc, a un antígeno o un FcγR, se pueden determinar usando un instrumento BIAcore (por ejemplo, un instrumento BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Como se analiza *supra*, véase la sección 5.4.1, puede usarse cualquier FcγR para evaluar la unión de las moléculas de la invención tanto cuando al menos un sitio de unión del epítipo de la molécula de diacuerpo reconoce inmuno-específicamente un FcγR, y/o como cuando la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc (o una parte del mismo). En una realización específica, el FcγR es el FcγRIIIA, preferiblemente un FcγRIIIA soluble monomérico. Por ejemplo, en una realización, el FcγRIIIA soluble monomérico es la región extracelular del FcγRIIIA unida a la secuencia conectora AVITAG). En otra realización específica, el FcγR es el FcγRIIB, preferiblemente un FcγRIIB soluble dimérico.

Para todos los ensayos inmunológicos, el reconocimiento/unión al FcγR por parte de una molécula descrita en la presente memoria se puede lograr mediante múltiples dominios: en determinadas realizaciones, las moléculas descritas en la presente memoria reconocen inmuno-específicamente un FcγR a través de uno de los múltiples dominios de unión a epítipo; en otras realizaciones más, cuando la molécula de la invención comprende un dominio Fc (o una parte del mismo), la molécula de diacuerpo puede reconocer inmuno-específicamente un FcγR a través de las interacciones Fc-FcγR; en otras realizaciones adicionales más, cuando una molécula de la invención comprende tanto un dominio Fc (o una parte del mismo) como un sitio de unión a epítipo que reconoce inmuno-específicamente un FcγR, la molécula de diacuerpo puede reconocer un FcγR a través de uno o de ambos de un dominio de unión al epítipo y del dominio Fc (o una parte del mismo). Un ejemplo de ensayo para la determinación de los parámetros cinéticos de una molécula que comprende múltiples dominios de unión a epítipo y, opcionalmente y dominio Fc (o una parte del mismo) a un antígeno y/o a un FcγR usando un instrumento BIAcore comprende lo siguiente: se inmoviliza un primer antígeno en una de las cuatro celdas de flujo de la superficie de un chip sensor, preferiblemente a través de una química de acoplamiento de amina, de tal forma que se inmovilicen aproximadamente 5000 unidades de respuesta (UR) de dicho primer antígeno en la superficie. Una vez se ha preparado la superficie adecuada, las moléculas de la descritas en la presente memoria que reconocen inmuno-específicamente dicho primer antígeno se hacen pasar a través de la superficie, preferiblemente mediante inyecciones de un minuto de una disolución de 20 µg/ml a un caudal de 5 µl/ml. Los niveles de las moléculas descritas en la presente memoria unidas a la superficie en esta fase normalmente varían entre 400 y 700 UR. Después, se inyectan unas series de diluciones de un segundo antígeno (por ejemplo, un FcγR) o de un receptor FcγR en tampón HBS-P (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, a un pH de 7,5) en la superficie a 100 µl/min. La regeneración de las moléculas entre las diferentes diluciones del segundo antígeno o del receptor se lleva a cabo preferiblemente mediante inyecciones individuales de 5 segundos de NaHCO₃ 100 mM a un pH de 9,4; NaCl 3 M. Se contempla cualquier técnica de regeneración conocida en la técnica en el método de la presente memoria.

Una vez recogida la totalidad del conjunto de datos, las curvas de unión resultantes se ajustan globalmente usando los algoritmos informáticos suministrados por el fabricante del instrumento SPR, por ejemplo, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan tanto la K_{on} como la K_{off} , a partir de las que se deduce la constante de unión en equilibrio aparente, K_d , como la relación entre las dos constantes de velocidad (es decir, K_{off}/K_{on}). Pueden encontrarse tratamientos más detallados de cómo se derivan las constantes de velocidad individuales en el BIAevaluation Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). El análisis de los datos generados puede llevarse a cabo usando cualquier método conocido en la técnica. Para una revisión de los diversos métodos de interpretación de los datos cinéticos generados, véase Myszk, (1997) "Kinetic Analysis Of Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance Biosensors," Current Opinion in Biotechnology 8: 50-7; Fisher et al. (1994) "Surface Plasmon Resonance Based Methods For Measuring The Kinetics And Binding Affinities Of Biomolecular Interactions," Current Opinion in Biotechnology 5: 389-95; O'Shannessy (1994) "Determination Of Kinetic Rate And Equilibrium Binding Constants For Macromolecular Interactions: A Critique Of The Surface Plasmon Resonance

Literature," Current Opinion in Biotechnology, 5:65-71; Chaiken *et al.* (1992) "Analysis Of Macromolecular Interactions Using Immobilized Ligands," Analytical Biochemistry, 201: 197-210; Morton *et al.* (1995) "Interpreting Complex Binding Kinetics From Optical Biosensors: A Comparison Of Analysis By Linearization, The Integrated Rate Equation, And Numerical Integration," Analytical Biochemistry 227: 176-85; O'Shannessy *et al.*, 1996, *Analytical Biochemistry* 236: 275-83.

En realizaciones preferidas pueden usarse los parámetros cinéticos determinados mediante el uso de un análisis de SPR, por ejemplo, BIAcore, como una medida predictiva de cómo funcionará una molécula descrita en la presente memoria en un ensayo funcional, por ejemplo, ADCC. Un ejemplo de método para la predicción de la eficacia de una molécula de la divulgación basado en los parámetros cinéticos obtenidos a partir de un análisis de SPR puede comprender lo siguiente: la determinación de los valores de la K_{off} para la unión de una molécula descrita en la presente memoria al Fc γ RIIIA y al Fc γ RIIB (a través de un dominio de unión al epítipo y/o de un dominio Fc (o parte del mismo)); la representación gráfica de (1) K_{off} (wt)/ K_{off} (mut) para el Fc γ RIIIA; (2) K_{off} (mut)/ K_{off} (wt) para el Fc γ RIIB frente a los datos de ADCC. Las cifras mayores de uno muestran una disminución en la velocidad de disociación para el Fc γ RIIIA y un aumento en la velocidad de disociación para el Fc γ RIIB con respecto al tipo silvestre; y posee y función de ADCC potenciada.

5.5 Métodos para la producción de moléculas de diacuerpo de la divulgación

Las moléculas de diacuerpo de la presente divulgación pueden producirse usando una diversidad de métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo la síntesis de proteínas *de novo* y la expresión recombinante de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión. Las secuencias de ácido nucleico deseadas pueden producirse mediante métodos recombinantes (por ejemplo, mutagénesis por PCR de una variante preparada previamente del polinucleótido deseado) o mediante síntesis de ADN en fase sólida. Habitualmente se usan métodos de expresión recombinante. También se describe un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un VH y/o un VL de CD16A, según reivindicación 1 de la presente memoria. También se describe un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un VH y/o un VL de CD32B de acuerdo con la reivindicación 1 de la presente memoria. Debido a la degeneración del código genético, diversas secuencias de ácido nucleico codifican cada secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina, y la presente descripción incluye todos los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión descritas en la presente memoria.

5.5.1 Polinucleótidos que codifican las moléculas de la divulgación

También se describen moléculas de la divulgación, incluyendo polipéptidos y anticuerpos. Los polinucleótidos que codifican las moléculas de la divulgación pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, mediante cualquier método conocido en la técnica.

Una vez se ha determinado la secuencia de nucleótidos de las moléculas mediante los métodos de la presente memoria, la secuencia de nucleótidos se puede manipular usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 3.^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; y Ausubel *et al.*, ed., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, NY), para generar, por ejemplo, anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, mediante la generación de sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos.

En una realización, pueden cribarse colecciones humanas o cualquier otra colección disponible en la técnica, mediante las técnicas convencionales conocidas en la técnica, para clonar los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la divulgación.

5.5.2 Expresión recombinante de moléculas de la divulgación

Una vez se ha obtenido una secuencia de ácido nucleico que codifica las moléculas de la divulgación (es decir, los anticuerpos), puede producirse el vector para la producción de las moléculas mediante la tecnología del ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para la construcción de los vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes de las moléculas de la divulgación y las señales de control de la transcripción y de la traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1990, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2.^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, y Ausubel *et al.* ed., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, NY).

Puede transferirse un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de una molécula identificada mediante los métodos de la presente memoria a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposómica y precipitación con fosfato de calcio) y después, las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir las moléculas de la divulgación. En realizaciones específicas, la expresión de las moléculas de la divulgación está regulada por un promotor constitutivo, inducible o específico tisular.

Las células hospedadoras usadas para expresar las moléculas identificadas mediante los métodos de la presente memoria pueden ser células bacterianas, tales como *Escherichia coli*, o, preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de una molécula de inmunoglobulina recombinante completa. En particular, las células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor génico temprano intermedio del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para las inmunoglobulinas (Foecking *et al.* (1986) "Powerful And Versatile Enhancer-Promoter Unit For Mammalian Expression Vectors," Gene 45:101-106; Cockett *et al.* (1990) "High Level Expression Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases In Chinese Hamster Ovary Cells Using Glutamine Synthetase Gene Amplification," Biotechnology 8:662-667).

Puede utilizarse una diversidad de sistemas de hospedador-vector de expresión para la expresión de las moléculas identificadas mediante los métodos de la presente memoria. Dichos sistemas de hospedador-expresión representan vehículos mediante los que pueden producirse las secuencias codificantes de las moléculas de la divulgación y purificarse posteriormente, pero también representan las células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, pueden expresar las moléculas de la divulgación *in situ*. Estas incluyen, aunque sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, de ADN de plásmido o de ADN de cósmido que contienen secuencias codificantes de las moléculas identificadas mediante los métodos de la presente memoria; de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión recombinantes que contienen las secuencias que codifican las moléculas identificadas mediante los métodos de la presente memoria; sistemas de células de insecto o infectados con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias que codifican las moléculas identificadas mediante los métodos de la presente memoria; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el virus del mosaico del tabaco (TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contienen secuencias que codifican las moléculas identificadas mediante los métodos de la presente memoria; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfocíticas (véase el documento U.S. 5807715), células Per C.6 (células de la retina humanas desarrolladas por Crucell) portadoras de construcciones de expresión recombinantes que contienen los promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor de la metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia).

En sistemas bacterianos puede seleccionarse ventajosamente una diversidad de vectores de expresión dependiendo del uso previsto para la molécula que se va a expresar. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de elevados niveles de los productos de la proteína de fusión que sean fácilmente purificables. Dichos vectores incluyen, aunque sin limitación, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Rüther *et al.* (1983) "Easy Identification Of cDNA Clones," EMBO J. 2:1791-1794), en el que la secuencia codificante del anticuerpo se puede ligar individualmente en el vector en marco con la región codificante de *lac Z*, de forma que se produzca una proteína de fusión; los vectores pIN (Inouye *et al.* (1985) "Up-Promoter Mutations In The *lpp* Gene Of *Escherichia Coli*," Nucleic Acids Res. 13:3101-3110; Van Heeke *et al.* (1989) "Expression Of Human Asparagine Synthetase In *Escherichia Coli*," J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. También pueden usarse los vectores pGEX para expresar polipéptidos exógenos en forma de proteínas de fusión con la S-transferasa de glutatión (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de las células lisadas mediante una adsorción y la unión a una matriz de microesferas de glutatión-agarosa, seguido de una elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir los sitios de escisión de la trombina o de la proteasa del factor Xa, de forma que el producto genérico diana clonado se pueda liberar desde la fracción de la GST.

En un sistema de insectos se usa el virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) como vector para la expresión de los genes exógenos. El virus crece en las células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor del AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

En las células hospedadoras de mamífero puede utilizarse una diversidad de sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se use un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción del adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico se puede insertar después en el genoma del adenovirus mediante una recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción de una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y que puede expresar la molécula de inmunoglobulina en los hospedadores infectados (véase, por ejemplo, Logan *et al.* (1984) "Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation Of mRNAs Late After Infection," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659). También pueden requerirse señales de inicio específicas para una traducción eficaz de las secuencias codificantes del anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y las secuencias adyacentes. Adicionalmente, el codón de inicio debe estar en el mismo marco de lectura de la secuencia

codificante deseada para asegurar la traducción de la totalidad del inserto. Estas señales de control de la traducción exógenas y los codones de inicio pueden ser de una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de los elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. apropiados (véase, Bitter *et al.* (1987) "*Expression And Secretion Vectors For Yeast*," *Methods in Enzymol.* 153:516-544).

Además, puede elegirse una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico de la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, una glucosilación) y el procesamiento (por ejemplo, la escisión) de los productos proteínicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los polipéptidos que comprenden una molécula de diacuerpo de la divulgación se pueden expresar en forma de un producto génico individual (por ejemplo, en forma de una cadena polipeptídica única, es decir, en forma de un precursor de poliproteína), lo que requiere una escisión proteolítica por parte de los mecanismos celulares nativos o recombinantes para formar los polipéptidos individuales de las moléculas de diacuerpo de la divulgación. También se describe la modificación de una secuencia de ácido nucleico para codificar una molécula precursora de poliproteína que comprende los polipéptidos del diacuerpo de la divulgación, que incluye secuencias codificantes que pueden dirigir la escisión postraducciona de dicho precursor poliproteínico. La escisión postraducciona del precursor poliproteínico da como resultado los polipéptidos del diacuerpo de la invención. La escisión postraducciona de la molécula precursora que comprende los polipéptidos de diacuerpo de la divulgación puede producirse *in vivo* (es decir, en la célula hospedadora por parte de los sistemas/mecanismos celulares nativos o recombinantes, por ejemplo, una escisión con furina en un sitio apropiado) o puede producirse *in vitro* (por ejemplo, la incubación de dicha cadena polipeptídica en una composición que comprende proteasas o peptidasas con una actividad conocida y/o en una composición que comprende condiciones o reactivos conocidos por fomentar la acción proteolítica deseada). La purificación y la modificación de las proteínas recombinantes son bien conocidas en la técnica, de forma que el diseño del precursor poliproteínico podría incluir una diversidad de realizaciones fácilmente reconocidas por un trabajador experto. Puede usarse cualquier proteasa o peptidasa conocida en la técnica para la modificación descrita de la molécula precursora, por ejemplo, la trombina (que reconoce la secuencia de aminoácidos LVPR[^]GS (SEQ ID NO: 89)) o el factor Xa (que reconoce la secuencia de aminoácidos I(E/D)GR[^] (SEQ ID NO: 90) (Nagai *et al.* (1985) "*Oxygen Binding Properties Of Human Mutant Hemoglobins Synthesized In Escherichia Coli*," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82:7252-7255, y revisado en Jenny *et al.* (2003) "*A Critical Review Of The Methods For Cleavage Of Fusion Proteins With Thrombin And Factor Xa*," *Protein Expr. Purif.* 31:1-11)), la enterocinasa (que reconoce la secuencia de aminoácidos DDDDK[^] (SEQ ID NO: 91) (Collins-Racie *et al.* (1995) "*Production Of Recombinant Bovine Enterokinase Catalytic Subunit In Escherichia Coli Using The Novel Secretory Fusion Partner DsbA*," *Biotechnology* 13:982-987)), la furina (que reconoce la secuencia de aminoácidos RXXR[^], con preferencia por la RX(K/R)R[^] (SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 93, respectivamente) (aparece una R adicional en la posición P6 para potenciar la escisión)) y la AcTEV (que reconoce la secuencia de aminoácidos ENLYFQ[^]G (SEQ ID NO: 94) (Parks *et al.* (1994) "*Release Of Proteins And Peptides From Fusion Proteins Using A Recombinant Plant Virus Proteinase*," *Anal. Biochem.* 216:413-417)) y la proteasa C3 del virus de la glosopeda. Véase, por ejemplo, la sección 6.4, *supra*.

Las diferentes células hospedadoras tienen unos mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraducciona y la modificación de las proteínas y de los productos génicos. Pueden elegirse las líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína exógena expresada. A este respecto, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, la glucosilación y la fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, aunque sin limitación, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

Para una producción a largo plazo de alto rendimiento de las proteínas recombinantes se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse líneas celulares que expresen de forma estable un anticuerpo en lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación víricos, las células hospedadoras se pueden transformar con un ADN controlado por los elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, un promotor, un potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador de selección. Después de la introducción del ADN exógeno, las células modificadas pueden dejarse en crecimiento durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección del plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para modificar líneas celulares que expresen los anticuerpos de la divulgación. Dichas líneas celulares modificadas pueden ser particularmente útiles en el cribado y la evaluación de los compuestos que interactúan directa o indirectamente con las moléculas de la divulgación.

Pueden usarse diversos sistemas de selección que incluyen, aunque sin limitación, el gen de la cinasa de timidina del virus del herpes simple (Wigler *et al.* (1977) "*Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells*," *Cell* 11: 223-232), la fosforibosiltransferasa de hipoxantina-guanina (Szybalska *et al.* (1992) "*Use Of The HPRT Gene And The HAT Selection Technique In DNA-Mediated Transformation Of Mammalian Cells: First Steps Toward Developing Hybridoma Techniques And Gene Therapy*," *Bioessays* 14: 495-500) y la

fosforribosiltransferasa de adenina (Lowy *et al.* (1980) "*Isolation Of Transforming DNA: Cloning The Hamster apt Gene*," Cell 22: 817-823) pueden emplearse en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. También puede usarse una resistencia antimetabolito como la base de la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.* (1980) "*Transformation Of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570; O'Hare *et al.* (1981) "*Transformation Of Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihydrofolate Reductase*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527-1531); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan *et al.* (1981) "*Selection For Animal Cells That Express The Escherichia coli Gene Coding For Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072-2076); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Tolstoshev (1993) "*Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions*," Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) "*The Basic Science Of Gene Therapy*," Science 260:926-932; y Morgan *et al.* (1993) "*Human Gene Therapy*," Ann. Rev. Biochem. 62:191-217) e hygromycin, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.* (1984) "*Expression Of Prokaryotic Genes For Hygromycin B And G418 Resistance As Dominant-Selection Markers In Mouse L Cells*," Gene 30:147-156). Los métodos conocidos habitualmente en la técnica de la tecnología del ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel *et al.* (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (ed), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin *et al.* (1981) "*A New Dominant Hybrid Selective Marker For Higher Eukaryotic Cells*," J. Mol. Biol. 150:1-14.

Los niveles de expresión de una molécula descrita en la divulgación pueden aumentarse mediante amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*. Vol. 3 (Academic Press, Nueva York, 1987). Cuando un marcador del sistema de vector que expresa un anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedadora aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con la secuencia de nucleótidos de un polipéptido de la molécula de diacuerpo, también aumentará la producción del polipéptido (Crouse *et al.* (1983) "*Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes*," Mol. Cell. Biol. 3:257-266).

La célula hospedadora se puede cotransfectar con dos vectores de expresión, el primer vector que codifica el primer polipéptido de la molécula de diacuerpo y el segundo vector que codifica el segundo polipéptido de la molécula de diacuerpo. Los dos vectores pueden contener marcadores de selección idénticos que permiten una expresión igualitaria de ambos polipéptidos. Como alternativa, puede usarse un único vector que codifique ambos polipéptidos. Las secuencias codificantes de los polipéptidos de las moléculas de la divulgación pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que se ha expresado recombinantemente una molécula de la divulgación (es decir, los diacuerpos), se puede purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de polipéptidos, de poliproteínas o de diacuerpos (por ejemplo, esquemas análogos a la purificación de anticuerpos basándose en la selectividad del antígeno), por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico (opcionalmente después de una selección con proteína A donde la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc (o parte del mismo)) y cromatografía en columna por tamaños), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de polipéptidos, de poliproteínas o de diacuerpos.

5.6 Métodos profilácticos y terapéuticos

Las moléculas de la divulgación son particularmente útiles para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, de un trastorno o de una infección donde se desea una función celular efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por el FcγR (por ejemplo, un cáncer, una enfermedad infecciosa). Como se analiza *supra*, los diacuerpos de la invención pueden mostrar una funcionalidad de tipo anticuerpo para desencadenar una función efectora, aunque la molécula de diacuerpo no comprenda un dominio Fc. Al comprender al menos un dominio de unión al epítipo que reconoce inmunoespecíficamente un FcγR, la molécula de diacuerpo puede mostrar una unión al FcγR y una actividad análoga a las interacciones Fc-FcγR. Por ejemplo, las moléculas de la divulgación pueden unirse a un antígeno de la superficie celular y a un FcγR (por ejemplo, un FcγRIIIA) de una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, un linfocito citotóxico natural), estimulando una función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc.) contra dicha célula.

También se describe, la molécula de diacuerpo de la invención comprende un dominio Fc (o parte del mismo). En dichas realizaciones, el dominio Fc puede comprender adicionalmente al menos una modificación de aminoácido con respecto a un dominio Fc de tipo silvestre (o parte del mismo) y/o puede comprender los dominios de uno o más isotipos de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Las moléculas de la invención que comprenden dominios Fc variantes pueden mostrar fenotipos conferidos o alterados con respecto a las moléculas que comprenden el dominio Fc de tipo silvestre, tal como una actividad de función efectora alterada o conferida (por ejemplo, según se ensaya en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófagos). Además, las moléculas descritas en la presente memoria con una actividad de función efectora conferida o alterada son útiles para el tratamiento y/o la prevención

de una enfermedad, de un trastorno o de una infección donde se desea un aumento en la eficacia de la función efectora. Como alternativa, las moléculas de diacuerpo de la presente memoria que comprenden un dominio Fc (o parte del mismo) median en la cascada dependiente del complemento. Los dominios Fc variantes identificados por alterar la función efectora se divulgan en la solicitud internacional WO 04/063351, en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos 2005/0037000 y 2005/0064514 y en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 2006-0134709 A1, presentada el 10 de noviembre de 2005, y 2006-0177439 A1, presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitudes simultáneas de los autores de la invención.

También se describen métodos y composiciones para el tratamiento, la prevención o el control de un cáncer en un sujeto, que comprenden la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas que comprenden uno o más sitios de unión a epítipo y opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo) modificado según lo descrito en la presente memoria, molécula que se une adicionalmente a un oncoantígeno. Las moléculas de la divulgación son particularmente útiles para la prevención, la inhibición, la reducción del crecimiento o la regresión de tumores primarios, de metástasis de células cancerosas y de enfermedades infecciosas. Aunque sin pretender estar ligados a ningún mecanismo de acción en particular, las moléculas de la divulgación median en la función efectora, lo que da como resultado la eliminación del tumor, la reducción del tumor o una combinación de los mismos. En realizaciones alternativas, los diacuerpos de la divulgación median en la actividad terapéutica mediante la reticulación de los antígenos y/o de los receptores de la superficie celular, y en la apoptosis o señalización reguladora del crecimiento negativo potenciadas.

Aunque sin pretender estar ligados a ningún mecanismo de acción en particular, las moléculas de diacuerpo de la divulgación muestran eficacia terapéutica potenciada con respecto a los anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica, en parte, debido a la capacidad del diacuerpo de unirse inmuno-específicamente a una célula diana que expresa un antígeno en particular (por ejemplo, FcγR) a unos niveles reducidos, por ejemplo, en virtud de la capacidad del anticuerpo de permanecer sobre la célula diana más tiempo debido a una avidéz mejorada de la interacción de diacuerpo-epítipo.

Los diacuerpos de la divulgación con afinidad y avidéz potenciadas por los antígenos (por ejemplo, FcγR) son particularmente útiles para el tratamiento, la prevención o el control de un cáncer, o de otra enfermedad o trastorno, en un sujeto, en el que los FcγR se expresan a bajos niveles en las poblaciones de células diana. Como se usa en la presente memoria, la expresión del FcγR en las células se define en términos de la densidad de dichas moléculas por célula según se mide mediante el uso de los métodos habituales conocidos por los expertos en la materia. Las moléculas descritas en la presente memoria que comprenden múltiples sitios de unión a epítipo y, opcionalmente y FcγR (o parte del mismo) preferiblemente tienen también una avidéz y una afinidad y/o una función efectora conferidas o potenciadas en las células que expresan un antígeno diana, por ejemplo, un oncoantígeno, a una densidad de 30 000 a 20 000 moléculas/célula, a una densidad de 20 000 a 10 000 moléculas/célula, a una densidad de 10 000 moléculas/célula o menos, a una densidad de 5000 moléculas/célula o menos, o a una densidad de 1000 moléculas/célula o menos. Las moléculas de la divulgación tienen utilidad en particular en el tratamiento, la prevención o el control de una enfermedad o de un trastorno, tal como un cáncer, en una subpoblación, en la que el antígeno objetivo se expresa a niveles bajos en la población de células diana.

Las moléculas de la divulgación también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento o la prevención de enfermedades, tales como un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, trastornos inflamatorios y enfermedades infecciosas. Las moléculas de la divulgación pueden usarse en combinación con anticuerpos monoclonales o quiméricos, linfocinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 e IL-7), que sirven, por ejemplo, para incrementar el número o la actividad de las células efectoras que interactúan con las moléculas y para incrementar la respuesta inmunitaria. Las moléculas de la divulgación también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con uno o más fármacos usados para el tratamiento de una enfermedad, de un trastorno o de una infección, tales como, por ejemplo, agentes antineoplásicos, agentes antiinflamatorios o agentes antivíricos, por ejemplo, como se detalla en la sección 5.7.

5.6.1 Cánceres

También se describen métodos y composiciones para el tratamiento o la prevención del cáncer en un sujeto, que comprenden la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas que comprenden múltiples dominios de unión a epítipo. También se describen métodos y composiciones para el tratamiento o la prevención del cáncer en un sujeto con polimorfismos de FcγR, tales como aquellos homocigóticos para los alelos FcγRIIIA-158V o FcγRIIIA-158F. También se describe la modificación de al menos un dominio de unión al epítipo de la molécula de diacuerpo para que se una inmuno-específicamente al FcγRIIIA (158F). También se describe la modificación de al menos un dominio de unión al epítipo de la molécula de diacuerpo para que se una inmuno-específicamente al FcγRIIIA (158V).

La eficacia del tratamiento con anticuerpo monoclonal convencional depende del polimorfismo de FcγR del sujeto (Cartron *et al.* (2002) "Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In IgG Fc Receptor FcRIIIA Gene," Blood 99: 754-758; Weng *et al.* (2003) "Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor

Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma," J Clin Oncol. 21(21):3940-3947). Estos receptores se expresan en la superficie de las células efectoras y median en la ADCC. Los alelos de alta afinidad, de los receptores de activación de baja afinidad, mejoran la capacidad de las células efectoras para mediar en la ADCC. Al contrario que los que se basan en las interacciones de Fc-FcγR para lograr la función efectora, los métodos de la presente memoria engloban la modificación de moléculas para que reconozcan inmuno-específicamente los receptores de activación de baja actividad, permitiendo diseñar moléculas para un polimorfismo específico. Alternativa o adicionalmente, la molécula descrita en la presente memoria se puede ser modificar para que comprenda un dominio Fc variante que muestre afinidad potenciada por FcγR (con respecto a un dominio Fc de tipo silvestre) en las células efectoras. Las moléculas modificadas descritas en la presente memoria proporcionan mejores reactivos de inmunoterapia para pacientes independientemente de su polimorfismo de FcγR.

Las moléculas de diacuerpo modificadas de acuerdo con la divulgación se ensayan mediante ADCC usando una línea celular cultivada o leucocitos PBMC derivados de un paciente, para determinar la capacidad de las mutaciones del Fc de potenciar la ADCC. La ADCC convencional se lleva a cabo usando los métodos divulgados en la presente memoria. Se recogen linfocitos de sangre periférica usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Las células diana, es decir, las líneas celulares cultivadas o células derivadas de un paciente, se cargan con europio (PerkinElmer) y se incuban con los efectores durante 4 h a 37 °C. El europio liberado se detecta usando un lector de placas fluorescentes (Wallac). Los datos resultantes de la ADCC indican la eficacia de las moléculas de la divulgación para desencadenar una citotoxicidad celular mediada por linfocitos NK y establecer qué moléculas pueden ensayarse con ambas muestras de pacientes y de monocitos sedimentados. Las moléculas de diacuerpo que muestran el mayor potencial para desencadenar una actividad de ADCC se ensayan después en un ensayo de ADCC usando los PBMC de pacientes. Se usan PBMC de donadores sanos como células efectoras.

También se describen métodos para la prevención o el tratamiento de un cáncer caracterizado por un oncoantígeno mediante la genomanipulación de la molécula de diacuerpo para que reconozca inmuno-específicamente dicho oncoantígeno, de forma que la propia molécula de diacuerpo sea citotóxica (por ejemplo, a través de la reticulación de los receptores de la superficie que da lugar a un aumento en la apoptosis, o a una regulación por disminución de las señales proliferativas) y/o comprenda un dominio Fc, de acuerdo con la divulgación, y/o medie en una o más funciones efectoras (por ejemplo, ADCC, fagocitosis). Los diacuerpos que se han genomanipulado de acuerdo con la divulgación son útiles para la prevención o el tratamiento del cáncer, dado que tienen una actividad citotóxica (por ejemplo, una destrucción potenciada de las células tumorales y/o, por ejemplo, actividad de ADCC o actividad de CDC potenciada).

Los cánceres asociados con un oncoantígeno pueden tratarse o prevenirse mediante la administración de un diacuerpo que se une al oncoantígeno y que es citotóxico, y/o que se ha modificado de acuerdo con los métodos de la presente memoria para que muestren función efectora. Por ejemplo, aunque sin limitación, los cánceres asociados con los siguientes oncoantígenos se pueden tratar o prevenir mediante los métodos y las composiciones descritos: el antígeno KS del pan-carcinoma 1/4 (Perez *et al.* (1989) "*Isolation And Characterization Of A Cdna Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker*," J. Immunol. 142:3662-3667; Möller *et al.* (1991) "*Bispecific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes*," Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216), el antígeno del carcinoma ovárico (CA125) (Yu *et al.* (1991) "*Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants*," Cancer Res. 51(2):468-475), el fosfato ácido prostático (Tailor *et al.* (1990) "*Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone*," Nucl. Acids Res. 18(16):4928), el antígeno específico prostático (Henttu *et al.* (1989) "*cDNA Coding For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes*," Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli *et al.* (1993) "*Molecular Cloning Of A Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen*," Cancer Res. 53:227-230), el antígeno asociado al melanoma p97 (Estin *et al.* (1989) "*Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97*," J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-454), el antígeno del melanoma gp75 (Vijayasardahl *et al.* (1990) "*The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product*," J. Exp. Med. 171(4):1375-1380), el antígeno del melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali *et al.* (1987) "*Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance*," Cancer 59:55-63; Mittelman *et al.* (1990) "*Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Anti-idiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies*," J. Clin. Invest. 86:2136-2144), el antígeno de membrana específico prostático, el antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon *et al.* (1995) "*Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotypic Antibody Vaccine*," J. Clin. Invest. 96(1):334-42), el antígeno mucínico epitelial polimorfo, el antígeno del glóbulo de grasa láctea humana, los antígenos asociados a tumores colorrectales tales como: CEA, TAG-72 (Yokota *et al.* (1992) "*Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms*," Cancer Res. 52:3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar *et al.* (1993) "*Effect Of Monoclonal Antibody 17-1A And GM-CSF In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma - Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced*," Int. J. Cancer 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn *et al.* (1982) "*Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma*," J. Clin. Immunol. 2:135-140), CTA-1 y LEA, el antígeno del linfoma de Burkitt

38.13, CD19 (Ghetie *et al.* (1994) "*Anti-CD19 Inhibits The Growth Of Human B-Cell Tumor Lines In Vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest*," Blood 83:1329-1336), el antígeno del linfoma B humano CD20 (Reff *et al.* (1994) "*Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20*," Blood 83:435-445), CD33 (Sgouros *et al.* (1993) "*Modeling And Dosimetry Of Monoclonal Antibody M195 (Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia*," J. Nucl. Med. 34:422-430), los antígenos específicos de melanoma tales como el gangliósido GD2 (Saleh *et al.* (1993) "*Generation Of A Human Antidiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen*," J. Immunol., 151, 3390-3398), el gangliósido GD3 (Shitara *et al.* (1993) "*A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3) Antibody With Enhanced Antitumor Activities*," Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380), el gangliósido GM2 (Livingston *et al.* (1994) "*Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside*," J. Clin. Oncol. 12:1036-1044), el gangliósido GM3 (Hoon *et al.* (1993) "*Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers*," Cancer Res. 53:5244-5250), el antígeno de la superficie celular tumoral específico del tipo de trasplante (TSTA) tales como los antígenos tumorales inducidos por virus, incluyendo antígenos T de virus tumorales de ADN y antígenos de la cubierta de virus tumorales de ARN, el antígeno de la alfa-fetoproteína oncofetal tal como el CEA de colon, el antígeno tumoral de vejiga oncofetal (Hellstrom *et al.* (1985) "*Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas*," Cancer. Res. 45:2210-2188), los antígenos de diferenciación tales como el antígeno del carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom *et al.* (1986) "*Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma*," Cancer Res. 46:3917-3923), los antígenos de fibrosarcoma, el antígeno de la leucemia de linfocitos T humana Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee *et al.* (1988) "*Idiotypic Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotype Cascade (Ab1, Ab2, and Ab3)*," J. Immunol. 141:1398-1403), la neoglucoproteína, los esfingolípidos, el antígeno del cáncer de mama tal como el EGFR (el receptor del factor de crecimiento epidérmico), el antígeno HER2 (p185^{HER2}), la mucina epitelial polimorfa (PEM) (Hilkens *et al.* (1992) "*Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property*," Trends in Biochem. Sci. 17:359-363), el antígeno de linfocitos humano maligno APO-1 (Trauth *et al.* (1989) "*Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis*," Science 245:301-304), el antígeno de diferenciación (Feizi (1985) "*Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens*," Nature 314:53-57) tal como el antígeno I encontrado en eritrocitos fetales y el endodermo primario, I(Ma) encontrado en adenocarcinomas gástricos, M18 y M39 encontrados en el epitelio mamario, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 y D156-22 encontrados en el cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en el adenocarcinoma de colon, F3 encontrado en el adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en el cáncer gástrico, hapteno Y, Le^y encontrados en células de carcinoma embrionarias, TL5 (grupo sanguíneo A), el receptor de EGF encontrado en células A431, la serie E₁ (grupo sanguíneo B) encontrado en el cáncer de páncreas, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionarias, de adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49, receptor de EGF, (grupo sanguíneo AL^e/Le^y) encontrado en adenocarcinoma de colon, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucinas del cáncer gástrico, T_{5A7} encontrado en células mieloides, R24 encontrado en melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, Gm2, OFA-2, Gd2, M1:22:25:8 encontrados en células de carcinoma embrionarias, y SSEA-3, SSEA-4 encontrado en embriones en la fase de 4-8 células. En otra realización, el antígeno es un péptido derivado del receptor de linfocitos T de un linfoma cutáneo de linfocitos T (véase, Edelson (1998) "*Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy*," Cancer J Sci Am. 4:62-71).

Cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse o prevenirse mediante los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, los siguientes: leucemias que incluyen, aunque sin limitación, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, leucemias eritroleucémicas y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como, aunque sin limitación, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica, tricoleucemia; policitemia vera; linfomas tales como, aunque sin limitación, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, aunque sin limitación, mieloma múltiple quiescente, mieloma no secretor, mieloma osteoesclerótico, leucemia plasmocítica, plasmocitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom; gammopatía monoclonal de significación indeterminada; gammopatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada; sarcomas del tejido óseo y conectivo tales como, aunque sin limitación, sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de gigantocitos, fibrosarcoma óseo, cordoma, sarcoma periosteal, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales que incluyen, aunque sin limitación, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama que incluye, aunque sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma lobular (microcítico), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer adrenal, que incluye, aunque sin limitación, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como, aunque sin limitación, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer de páncreas, que incluye, aunque sin limitación, insulinooma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor carcinoide o de las células de los islotes; cánceres

de la pituitaria que incluyen, aunque sin limitación, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cánceres oculares que incluyen, aunque sin limitación, melanoma ocular tal como melanoma de iris, melanoma de la coroides y melanoma del cuerpo ciliar y retinoblastoma; cánceres de vagina que incluyen, aunque sin limitación, carcinoma epidermoide, adenocarcinoma y melanoma; cáncer de vulva que incluye, aunque sin limitación, carcinoma epidermoide, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres cervicales que incluyen, aunque sin limitación, carcinoma epidermoide y adenocarcinoma; cánceres de útero que incluyen, aunque sin limitación, carcinoma endometrial y sarcoma de útero; cánceres de ovario que incluyen, aunque sin limitación, carcinoma epitelial de ovario, tumor intermedio, tumor de las células germinales y tumor estromal; cánceres de esófago que incluyen, aunque sin limitación, cáncer epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma quístico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoepidermoide, sarcoma, melanoma, plasmocitoma, carcinoma verrucoso y carcinoma indiferenciado (microcítico); cánceres de estómago que incluyen, aunque sin limitación, adenocarcinoma, neoplásico (polipoide), ulcerativo, de diseminación superficial, de diseminación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado que incluyen, aunque sin limitación, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de la vesícula biliar que incluyen, aunque sin limitación, adenocarcinoma; colangiocarcinomas que incluyen, aunque sin limitación, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón que incluyen, aunque sin limitación, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma epidermoide (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón microcítico; cánceres testiculares que incluyen, aunque sin limitación, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma teratoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata que incluyen, aunque sin limitación, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma y rabdomiosarcoma; cánceres de pene; cánceres orales que incluyen, aunque sin limitación, carcinoma epidermoide; cánceres basales; cánceres de las glándulas salivares que incluyen, aunque sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoquístico; cánceres de faringe que incluyen, aunque sin limitación, cáncer epidermoide y verrucoso; cánceres de piel que incluyen, aunque sin limitación, carcinoma de células basales, carcinoma epidermoide y melanoma, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón que incluyen, aunque sin limitación, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (de la pelvis renal y/o del uréter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga que incluyen, aunque sin limitación, carcinoma de células transicionales, cáncer epidermoide, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, algunos cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de dichos trastornos, véase Fishman *et al.* (1985) *Medicine*, 2.^a Ed., J.B. Lippincott Co., Filadelfia; y Murphy *et al.* (1997) *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos de América).

Por consiguiente, los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria también son útiles en el tratamiento o la prevención de una diversidad de cánceres o de otras enfermedades proliferativas anómalas que incluyen, (aunque sin limitación) las siguientes: carcinoma, que incluyen, de vejiga, de mama, de colon, de riñón, de hígado, de pulmón, de ovario, de páncreas, de estómago, de próstata, de cuello de útero, de tiroides y de piel; que incluyen, carcinoma epidermoide; tumores hematopoyéticos de la estirpe linfoide que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de la estirpe mieloides que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas, y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso que incluyen fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, que incluyen, melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso que incluyen fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen, melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. También se contempla que los cánceres causados por aberraciones en la apoptosis se puedan tratar también mediante los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria. Dichos cánceres pueden incluir, aunque sin limitación, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones en p53, tumores de mama hormonodependientes, lesiones precancerosas de próstata y de ovario tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, los cambios malignos o disproliferativos (tales como metaplasias y displasias) o los trastornos hiperproliferativos se tratan o se previenen mediante los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria en el ovario, la vejiga, la mama, el colon, el pulmón, la piel, el páncreas o el útero. En otras realizaciones específicas se trata o se previene el sarcoma, el melanoma o la leucemia mediante los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria.

En una realización específica, una molécula descrita en la presente memoria (por ejemplo, un diacuerpo que comprende múltiples dominios de unión a epítipo y, opcionalmente y dominio Fc (o parte del mismo)) inhibe o reduce el crecimiento de las células cancerosas en al menos un 99 %, al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, al menos un 50 %, al menos un 45 %, al menos un 40 %, al menos un 35 %, al menos un 30 %, al menos un 25 %, al menos un 20 % o al menos un 10 % con respecto al crecimiento de las células cancerosas en ausencia de dicha molécula descrita en la presente memoria.

En una realización específica, una molécula descrita en la presente memoria (por ejemplo, un diacuerpo que comprende múltiples dominios de unión a epítipo y, opcionalmente y dominio Fc (o parte del mismo)) destruye las células o inhibe o reduce el crecimiento de las células cancerosas al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 100 % mejor que la molécula precursora.

5.6.2 Enfermedad autoinmunitaria y enfermedades inflamatorias

En algunas realizaciones, las moléculas de la divulgación comprenden un dominio de unión a epítipo específico para el Fc γ RIIB y/o un dominio Fc variante (o parte del mismo), modificado de acuerdo con métodos descritos en la presente memoria, cuyo dominio Fc muestra una mayor afinidad por el Fc γ RIIB y una afinidad disminuida por el Fc γ RIIA y/o por el Fc γ RIIA con respecto a un dominio Fc de tipo silvestre. Las moléculas de la divulgación con dichas características de unión son útiles en la regulación de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, en la inhibición de la respuesta inmunitaria en relación con enfermedades autoinmunitarias o con enfermedades inflamatorias. Aunque sin pretender estar ligados a ningún mecanismo de acción, las moléculas de la divulgación con una afinidad por el Fc γ RIIB y/o que comprenden un dominio Fc con una afinidad aumentada por el Fc γ RIIB y una afinidad disminuida por el Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIA pueden dar lugar a una amortiguación en la respuesta de activación del Fc γ R y a una inhibición en la sensibilidad celular, y, por tanto, tienen eficacia terapéutica para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno autoinmunitario.

También se describen métodos para la prevención, el tratamiento o el control de uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto, que comprenden adicionalmente la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios. También se describen métodos para la prevención, el tratamiento o el control de uno o más síntomas asociados con una enfermedad autoinmunitaria, que comprenden adicionalmente la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores. La sección 5.7 proporciona ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios y de agentes inmunomoduladores.

Ejemplos de trastornos autoinmunitarios que se pueden tratar mediante la administración de las moléculas de la presente divulgación incluyen, aunque sin limitación, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmunitaria de Addison, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitaria, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide vesicular, cardiomiopatía, dermatitis herpetiforme, síndrome de disfunción inmunitaria por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de la aglutinina fría, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopenia idiopática (ITP), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes sacarina de tipo 1 o inmunitaria, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de takayasu, arteritis temporal/arteritis de gigantocitos, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como dermatitis, vasculitis herpetiforme, vitiligo y granulomatosis de Wegener. Ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, aunque sin limitación, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía no diferenciada, artropatía no diferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones crónicas víricas o bacterianas. Como se describe en la presente memoria en la sección 2.2.2, algunos trastornos autoinmunitarios están asociados con una afección inflamatoria. Por tanto, hay un solapamiento entre lo que se considera un trastorno autoinmunitario y un trastorno inflamatorio. Por lo tanto, algunos trastornos autoinmunitarios también se pueden caracterizar como trastornos inflamatorios. Ejemplos de trastornos inflamatorios que pueden prevenirse, tratarse o atenderse de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía no diferenciada, artropatía no diferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones crónicas víricas o bacterianas.

Las moléculas de la divulgación que comprenden al menos un dominio de unión a epítipo específico para el Fc γ RIIB y/o un dominio Fc variante con una afinidad potenciada por el Fc γ RIIB y una afinidad disminuida por el Fc γ RIIA también pueden usarse para reducir la inflamación experimentada por animales, particularmente mamíferos, con trastornos inflamatorios. En una realización específica, una molécula de la divulgación reduce la inflamación en un animal en al menos un 99 %, en al menos un 95 %, en al menos un 90 %, en al menos un 85 %, en al menos un 80 %, en al menos un 75 %, en al menos un 70 %, en al menos un 60 %, en al menos un 50 %, en al menos un 45 %, en al menos un 40 %, en al menos un 45 %, en al menos un 35 %, en al menos un 30 %, en al menos un 25 %, en al

menos un 20 % o en al menos un 10 % con respecto a la inflamación en un animal al que no se le ha administrado dicha molécula.

Las moléculas de la divulgación que comprenden al menos un dominio de unión a epítipo específico para el FcγRIIB y/o un dominio Fc variante con una afinidad potenciada por el FcγRIIB y una afinidad disminuida por el FcγRIIA también pueden usarse para prevenir el rechazo de trasplantes.

5.6.3 Enfermedad infecciosa

También se describen métodos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad infecciosa en un sujeto, que comprenden la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas de la divulgación que comprenden al menos un dominio de unión a epítipo específico para un agente infeccioso asociado con dicha enfermedad infecciosa. En determinadas realizaciones, las moléculas de la divulgación son tóxicas para el agente infeccioso, aumentan la respuesta inmunitaria contra dicho agente o aumentan la función efectora contra dicho agente, con respecto a la respuesta inmunitaria en ausencia de dicha molécula. Enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse con las moléculas de la divulgación están causadas por agentes infecciosos que incluyen, aunque sin limitación, virus, bacterias, hongos, protozoos y virus.

Enfermedades víricas que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la divulgación junto con los métodos descrito en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, las causadas por la hepatitis de tipo A, la hepatitis de tipo B, la hepatitis de tipo C, la gripe, la varicela, adenovirus, el herpes simple de tipo I (HSV-I), el herpes simple de tipo II (HSV-II), la peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, el virus respiratorio sincitial, el virus del papiloma, papovavirus, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, virus coxsackie, el virus de las paperas, el virus del sarampión, el virus de la rubéola, poliovirus, viruela, el virus de Epstein Barr, el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I (VIH-I), el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo II (VIH-II) y agentes de enfermedades víricas tales como meningitis vírica, encefalitis, dengue o viruela.

Enfermedades bacterianas que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la divulgación junto con los métodos descritos en la presente memoria, que están causadas por bacterias incluyen, aunque sin limitación, micobacterias rickettsia, micoplasma, *Neisseria*, *S. pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Bacillus anthracis* (carbunco), tétanos, estreptococos, estafilococos, micobacteria, tétanos, pertussis, cólera, peste, difteria, clamidia, *S. aureus* y legionela.

Enfermedades por protozoos que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la divulgación junto con los métodos descritos en la presente memoria, que están causadas por protozoos incluyen, aunque sin limitación, leishmania, coccidios, tripanosoma o malaria.

Enfermedades por parásitos que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la divulgación junto con los métodos descritos en la presente memoria, que están causadas por parásitos incluyen, aunque sin limitación, clamidia y rickettsia.

De acuerdo con un aspecto de la invención, las moléculas de la divulgación que comprenden al menos un dominio de unión a epítipo específico para un agente infeccioso muestran una función efectora de anticuerpo hacia dicho agente, por ejemplo, una proteína patógena. Ejemplos de agentes infecciosos incluyen, aunque sin limitación, bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecialis*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* y *Pseudomonas aeruginosa*), un patógeno (por ejemplo, papovavirus linfotrópico B (LPV); *Bordetella pertussis*; el virus de la enfermedad de Borna (BDV); coronavirus bovino; el virus de la coriomeningitis; el virus del Dengue; un virus, *E. coli*; Ébola; Ecovirus 1; Ecovirus-11 (EV); endotoxina (LPS); bacterias entéricas; el virus huérfano entérico; enterovirus; el virus de la leucemia felina; el virus de la glosopeda; el virus de la leucemia del gibbon (GALV); bacterias gramnegativas; *Helicobacter pylori*; el virus de la hepatitis B (HBV); el virus del herpes simple; el VIH-1; citomegalovirus humanos; coronavirus humanos; gripe A, B y C; legionela; *Leishmania mexicana*; *Listeria monocytogenes*; el virus del sarampión; meningococos; morbillivirus; el virus de la hepatitis de ratón; el virus de la leucemia murina; el virus del herpes gamma murino; retrovirus murinos; el virus de la hepatitis de ratón, coronavirus murino; *Mycobacterium avium*-M; *Neisseria gonorrhoeae*; el virus de la enfermedad de Newcastle; el parvovirus B19; *Plasmodium falciparum*; el virus de la varicela; *Pseudomonas*; rotavirus; *Salmonella typhimurium*; *Shigella*; estreptococos; el virus linfotrópico de los linfocitos T 1; el virus vaccinia).

5.6.4 Desintoxicación

También se describen métodos de desintoxicación en un sujeto expuesto a una toxina (por ejemplo, una molécula de fármaco tóxica), que comprenden la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas de la divulgación que comprenden al menos un dominio de unión a epítipo específico para la molécula de fármaco tóxica. En determinadas realizaciones, la unión de una molécula de la divulgación a la toxina reduce o elimina el efecto fisiológico adverso de dicha toxina. En otras realizaciones más, la unión de un anticuerpo de la divulgación a la toxina incrementa o potencia la eliminación, la degradación o la neutralización de la toxina con respecto a la eliminación, la degradación o la neutralización en ausencia de dicho anticuerpo. La inmunotóxicoterapia de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria puede usarse para el tratamiento de sobredosis o de

exposición a fármacos que incluyen, aunque sin limitación, digixina, PCP, cocaína, colchicina y antidepresivos tricíclicos.

5.7 Tratamiento de combinación

También se describe la administración de las moléculas de la divulgación en combinación con otros tratamientos conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento o la prevención del cáncer, de una enfermedad autoinmunitaria, de una enfermedad infecciosa o de una intoxicación, incluyendo, aunque sin limitación, las actuales quimioterapias convencionales o experimentales, tratamientos hormonales, tratamientos biológicos, inmunoterapias, radioterapias o cirugía. En algunas realizaciones, las moléculas de la divulgación se pueden administrar en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes, anticuerpos terapéuticos u otros agentes conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, de una enfermedad autoinmunitaria, de una enfermedad infecciosa o de una intoxicación.

En determinadas realizaciones, se administra una o más moléculas de la divulgación a un mamífero, preferiblemente a un ser humano, simultáneamente con uno o más de otros agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de cáncer. El término "simultáneamente" no está limitado a la administración de agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino que más bien significa que una molécula de la divulgación y el otro agente se administran a un mamífero en una secuencia y en un intervalo de tiempo tal que la molécula de la divulgación puede actuar junto con el otro agente para proporcionar un aumento en el beneficio con respecto a si se administraran de otro modo. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, tratamiento hormonal o tratamiento biológico) se puede administrar al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en puntos temporales diferentes; sin embargo, si se administran al mismo tiempo, deberían administrarse lo suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico se puede administrar por separado, en cualquier forma apropiada y mediante cualquier vía adecuada. En diversas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con menos de 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, con entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas de diferencia, con entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 3 horas de diferencia, con entre aproximadamente 3 horas y aproximadamente 4 horas de diferencia, con entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 5 horas de diferencia, con entre aproximadamente 5 horas y aproximadamente 6 horas de diferencia, con entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 7 horas de diferencia, con entre aproximadamente 7 horas y aproximadamente 8 horas de diferencia, con entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 9 horas de diferencia, con entre aproximadamente 9 horas y aproximadamente 10 horas de diferencia, con entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 11 horas de diferencia, con entre aproximadamente 11 horas y aproximadamente 12 horas de diferencia, con no más de 24 horas de diferencia o con no más de 48 horas de diferencia. En realizaciones preferidas, dos o más componentes se administran en la misma visita del paciente.

En otras realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con entre aproximadamente 2 y 4 días de diferencia, con entre aproximadamente 4 y 6 días de diferencia, con aproximadamente 1 semana de diferencia, con entre aproximadamente 1 y 2 semanas de diferencia, o con más de 2 semanas de diferencia. En las realizaciones preferidas, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran en un marco temporal en el que ambos agentes todavía son activos. El experto en la materia será capaz de determinar dicho marco temporal mediante la determinación de la semivida de los agentes administrados.

En determinadas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran cíclicamente a un sujeto. El tratamiento cíclico implica la administración de un primer agente durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de un segundo agente y/o de un tercer agente durante un periodo de tiempo, y la repetición de esta administración secuencial. El tratamiento cíclico puede reducir al desarrollo de resistencia a uno o más tratamientos, evitar o reducir los efectos secundarios de uno de los tratamientos y/o mejora la eficacia del tratamiento.

En determinadas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran en un ciclo de menos de aproximadamente 3 semanas, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez cada 10 días o aproximadamente una vez cada semana. Un ciclo puede comprender la administración de un agente terapéutico o profiláctico mediante una infusión durante aproximadamente 90 minutos cada ciclo, aproximadamente 1 hora cada ciclo, aproximadamente 45 minutos cada ciclo. Cada ciclo puede comprender al menos 1 semana de reposo, al menos 2 semanas de reposo, al menos 3 semanas de reposo. El número de ciclos administrados es de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 ciclos, más normalmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 ciclos, y más normalmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 ciclos.

En otras realizaciones más, los agentes terapéuticos y profilácticos de la invención se administran con unas pautas posológicas regulares, mediante infusión continua o mediante administración frecuente sin periodos de reposo prolongados. Dicha administración regular puede implicar la dosificación a unos intervalos constantes sin periodos de reposo. Normalmente, los agentes terapéuticos, en particular los agentes citotóxicos, se usan a las dosis más bajas. Dichas pautas posológicas engloban la administración crónica diaria de unas dosis relativamente bajas

durante unos periodos prolongados de tiempo. En realizaciones preferidas, el uso de dosis bajas puede minimizar los efectos tóxicos secundarios y eliminar los periodos de reposo. En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos y profilácticos se administran mediante infusión crónica a baja dosis o continua que varía de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 2 días, a aproximadamente 1 semana, a aproximadamente 2 semanas, a aproximadamente 3 semanas, a aproximadamente 1 mes, a aproximadamente 2 meses, a aproximadamente 3 meses, a aproximadamente 4 meses, a aproximadamente 5 meses, a aproximadamente 6 meses. La cronología de dichas pautas posológicas se puede optimizar por el oncólogo.

En otras realizaciones, los ciclos de tratamiento se administran simultáneamente a un mamífero, es decir, se administran dosis individuales de los productos terapéuticos por separado todavía en un intervalo de tiempo tal que las moléculas de la divulgación pueden trabajar junto con el (los) otro(s) agente(s). Por ejemplo, un componente se puede administrar una vez por semana junto con los otros componentes, que se pueden administrar una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En otras palabras, las pautas posológicas de los productos terapéuticos se llevan a cabo simultáneamente incluso si los productos terapéuticos no se administran simultáneamente o en la misma visita del paciente.

Cuando se usan en combinación con otros agentes terapéuticos y/o profilácticos, las moléculas de la divulgación y el agente profiláctico y/o terapéutico pueden actuar aditivamente, o más preferiblemente, sinérgicamente. Una molécula de la divulgación se puede administrar simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos en la misma composición terapéutica. Una molécula de la divulgación se puede administrar simultáneamente con uno o más de otros agentes terapéuticos en composiciones farmacéuticas por separado. Una molécula de la divulgación se puede administrar antes o después de la administración de otro agente profiláctico o terapéutico. También se describe la administración de una molécula de la divulgación en combinación con otros agentes profilácticos o terapéuticos a través de la misma o de diferentes vías de administración, por ejemplo, oral y parenteral. Cuando se administra una molécula de la divulgación simultáneamente con otro agente profiláctico o terapéutico que potencialmente produce efectos secundarios adversos que incluyen, aunque sin limitación, toxicidad, el agente profiláctico o terapéutico puede administrarse ventajosamente a una dosis que está por debajo del umbral que desencadena el efecto secundario adverso.

Las cantidades y las frecuencias de las dosis de la administración proporcionada en la presente memoria están englobadas por los términos terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. La dosis y la frecuencia variarán normalmente de acuerdo con factores específicos de cada paciente dependiendo del agente terapéutico o profiláctico específico administrado, de la gravedad y del tipo de cáncer, de la vía de administración, así como de la edad, del peso corporal, de la respuesta y de los antecedentes médicos del paciente. Las pautas adecuadas se pueden seleccionar por el experto en la materia teniendo en consideración dichos factores, y siguiendo, por ejemplo, las dosis indicadas en la bibliografía y recomendadas en el Physician's Desk Reference (56.^a ed., 2002).

5.7.1 Agentes antineoplásicos

También se describe la administración de una o más moléculas de la divulgación con uno o más agentes terapéuticos usados para el tratamiento y/o la prevención de cáncer. En una realización, pueden administrarse inhibidores de la angiogénesis en combinación con las moléculas de la divulgación. Inhibidores de la angiogénesis que pueden usarse en los métodos y en las composiciones descritos en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación: Angiostatina (un fragmento de plasminógeno); antitrombina III antiangiogénica; Angiozima; ABT-627; Bay 12-9566; Benefina; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidores derivados de cartílago (CDI); CAI; el fragmento del complemento CD59; CEP-7055; Col 3; Combretastatina A-4; Endostatina (un fragmento de colágeno XVIII); un fragmento de fibronectina; Gro-beta; Halofuginona; Heparinasas; un fragmento de hexasacárido de heparina; HMV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; Interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por interferón (IP-10); Interleucina 12; Kringle 5 (un fragmento de plasminógeno); Marimastat; inhibidores de la metaloproteínasa (TIMP); 2-Metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); el AcMc IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; el inhibidor de la ribonucleasa placentaria; el inhibidor del activador del plasminógeno; el factor plaquetario 4 (PF4); Prinomastat; un fragmento de la prolactina de 16 kDa; la proteína relacionada con la proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; retinoides; Solimastat; escualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; tetrahidrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; tromboespondina 1 (TSP-1); TNP-470; el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β); vasculostatina; vasostatina (un fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de la transferasa de farnesilo (FTI); y bisfosfonatos.

Agentes antineoplásicos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la divulgación incluyen, aunque sin limitación: acivicina; aclarrubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar de sodio; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carrubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de

dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflomitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flucitabina; fosquidona; fostriecina de sodio; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiaurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofofina; interleucina II (incluyendo la interleucina II recombinante, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-I a; interferón gamma-I b; iproplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol de sodio; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalano; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato de sodio; metoprina; meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; omaplantino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; piposulfano; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfimer de sodio; porfiomicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato de sodio; esparfosomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan de sodio; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorrelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vaporeotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinapridina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorubicina. Otros fármacos antineoplásicos incluyen, aunque sin limitación: 20-epi-1,25-dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiratorona; aclarrubicina; acilofulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; irografolida; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; antiproteína morfogenética dorsalizante 1; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplaston; oligonucleótidos de antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; desaminasa de arginina; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados beta lactámicos; beta-aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inhibidor del bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistratona A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; IL-2 de la viruela del canario; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado del cartílago; carzelesina; inhibidores de la cinasa de caseína (ICOS); castanoespermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de la criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshiodridamnina B; desloreline; dexametasona; dexifosfamida; dextrazoxano; dexverapamilo; diaziquona; didamnina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflomitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epiristerida; análogo de estramustina; agonistas estrogénicos; antagonistas estrogénicos; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirin gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de la gelatinasa; gemcitabina; inhibidores del glutatión; hepsulfamo; heregulina; hexametilén bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofofina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento insulinoide 1; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalaalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptolestatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón leucocítico alfa; leuprolida estrógeno progesterona; leuprorrelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de la matrilisina; inhibidores de la metaloproteínasa de la matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor del MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario mal emparejado; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos mitotóxica-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A + sk de la pared celular de miobacterias; mopidamol; inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos; tratamiento basado en el supresor de tumores múltiples 1; agente antineoplásico de mostaza; micaperóxido B; extracto de la pared celular de micobacterias; miriaporona; N-acetilidinalina; benzamidas N-sustituidas; nafareline; nagrestip; naloxona pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridróico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante de nítróido; nitrulina; O6 -benciloguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona;

ondansetrón; ondansetrón; oacina; inductor de la citocina oral; omaplatino; osatorona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazelitina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato pentosan sódico; pentostatina; pentozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perilílico; fenazinicina; fenilacetato; inhibidores de la fosfatasa; picibanil; clorhidrato de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidores de la activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfimer de sodio; porfiomicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmunitario basado en la proteína A; inhibidor de la cinasa de proteína C; inhibidores de la cinasa de proteína C, de microalgas; inhibidores de la fosfatasa de tirosina de proteína; inhibidores de la fosforilasa de nucleósido de purina; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietylén hemoglobina piridoxilado; antagonistas raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de la transferasa de la proteína ras de famesilo; inhibidores ras; inhibidor ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohitukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidores derivados de la senescencia 1; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión al antígeno de cadena única; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a la somatomedina; sonarina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiatrina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidor de la división de las células madre; estipiámina; inhibidores de la estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glucosaminoglucanos sintéticos; talimustina; metyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalan de sodio; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporquina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazolina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de la trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de la timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante del tiroides; etiopurpurina de etil estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre totipotente; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorrelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de la cinasa de tirosina; tirfostinas; inhibidores de la UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de la urocinasa; vaporeotida; variolina B; sistema de vector, genoterapia eritrocitaria; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimalamer zinostatina. Fármacos antineoplásicos adicionales preferidos son 5-fluorouracilo y leucovorina.

Ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en los métodos descritos en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un anticuerpo monoclonal inmunosupresor humanizado anti-CD25 para la prevención del rechazo agudo de un aloinjerto renal; PANOREX™ que es un anticuerpo murino antiantígeno de la superficie celular 17-IA de la IgG2a (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo murino antiidiotípico (epítipo GD3) de la IgG (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo quimérico anti-EGFR de la IgG (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo humanizado antiintegrina $\alpha V\beta 3$ (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Smart M195 que es un anticuerpo humanizado anti-CD33 de la IgG (Protein Design Lab/Kanebo); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo humanizado anti-CD22 de la IgG (Immunomedics); ICM3 es un anticuerpo humanizado anti-ICAM3 (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo primatizado anti-CD80 (IDEC Pharm/Mitsubishi); IDEC-131 es un anticuerpo humanizado anti-CD40L (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo primatizado anti-CD4 (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo primatizado anti-CD23 (IDEC/Seikagaku); SMA^T anti-CD3 es un humanizado anti-CD3 de la IgG (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo humanizado anti-factor del complemento 5 (C5) (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo humanizado anti-TNF- α (CAT/BASF); CDP870 es un antifragemento Fab humanizado del TNF- α (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo primatizado anti-CD4 de la IgG1 (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo humano anti-CD4 de la IgG (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo humanizado anti-TNF- α de la IgG4 (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo humanizado anti- $\alpha 4\beta 7$ (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo humanizado anti-CD4 de la IgG (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo humanizado anti-CD40L de la IgG (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo humanizado anti-VLA-4 de la IgG (Elan); y CAT-152 es un anticuerpo humano anti-TGF- β_2 (Cambridge Ab Tech). Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse se presentan en la tabla 8.

Tabla 8: Anticuerpos terapéuticos antineoplásicos

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
Abgenix	ABX-EGF	Cáncer	Receptor de EGF
AltaRex	OvaRex	Cáncer de ovario	Antígeno tumoral CA125
	BravaRex	Cánceres metastásicos	Antígeno tumoral MUC1

Antisoma	Theragyn (pemtumomab- itrio-90)	Cáncer de ovario	Antígeno PEM
	Therex	Cáncer de mama	Antígeno PEM
Boehringer Ingelheim	Blvatuzumab	Cáncer de cabeza y cuello	CD44
Centocor/J&J	Panorex	Cáncer colorrectal	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIb/IIIa
	ReoPro	MI aguda	gp IIb/IIIa
	ReoPro	Apoplejía isquémica	gp IIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHL	CD20
CRC Technology	MAB, idiotípico 105AD7	Vacuna de cáncer colorrectal	gp72
Crucell	Anti-EpCAM	Cáncer	Ep-CAM
Cytoclonal	MAB, cáncer pulmonar	Cáncer pulmonar no microcítico	NA
Genentech	Herceptin	Cáncer de mama metastásico	HER-2
	Herceptin	Cáncer de mama en estadio inicial	HER-2
	Rituxan	NHL de bajo grado o folicular recidivante/resistente	CD20
	Rituxan	NHL intermedio y de alto grado	CD20
	MAB-VEGF	NSCLC, metastásico	VEGF
	MAB-VEGF	Cáncer colorrectal, metastásico	VEGF
	AMD Fab	Degeneración macular senil	CD18
	E-26 (IgE de 2.ª gen.)	Asma alérgico y rinitis	IgE
IDEC	Zevalin (Rituxan + itrio-90)	NHL de linfocitos B, de bajo grado o folicular, recidivante o resistente, CD20-positivo y NHL resistente a Rituximab	CD20
ImClone	Cetuximab + irinotecán	Carcinoma colorrectal resistente	Receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino y radiación	Cáncer de cabeza y cuello recién diagnosticado o recidivante	Receptor de EGF
	Cetuximab + gemcitabina	Carcinoma pancreático metastásico recién diagnosticado	Receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino + 5FU o Taxol	Cáncer de cabeza y cuello recidivante o metastásico	Receptor de EGF
	Cetuximab + carboplatino + paclitaxel	Carcino pulmonar no microcítico recién diagnosticado	Receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino	Cáncer de cabeza y cuello (enfermedad local- regional incurable extendida y metástasis distantes)	Receptor de EGF
	Cetuximab + radiación	Carcinoma de cabeza y cuello avanzado localmente	Receptor de EGF
	BEC2 + Bacilo de Calmette	Carcinoma pulmonar microcítico	Imita gangliósido

	Guerin		GD3
	BEC2 + Bacilo de Calmette Guerin	Melanoma	Imita gangliósido GD3
	IMC-1C11	Cáncer colorrectal con metástasis hepáticas	Receptor de VEGF
ImmonoGen	nuC242-DM1	Cáncer colorrectal, gástrico y pancreático	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	Linfoma no hodgkiniano	CD22
	LymphoCide Y-90	Linfoma no hodgkiniano	CD22
	CEA-Cide	Tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Cide Y-90	Tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer colorrectal (radioimágenes)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer de mama (radioimágenes)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer pulmonar (radioimágenes)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Tumores intraoperatorios (radioimágenes)	CEA
	LeukoScan (sulesomab marcado con Tc-99m)	Infección de tejido blando (radioimágenes)	CEA
	LymphoScan (marcado con Tc-99m)	Linfomas (radioimágenes)	CD22
	AFP-Scan (marcado con Tc-99m)	Cánceres hepáticos de células germinativas (radioimágenes)	AFP
Intracel	HumaRAD-HN (+ itrio-90)	Cáncer de cabeza y cuello	NA
	HumaSPECT	Imágenes colorrectales	NA
Medarex	MDX-101 (CTLA-4)	Cáncer de próstata y otros cánceres	CTLA-4
	MDX-210 (sobrexpresión de her-2)	Cáncer de próstata	HER-2
	MDX-210/MAK	Cáncer	HER-2
MedImmune	Vitaxin	Cáncer	$\alpha v \beta_3$
Merck KGaA	MAb 425	Diversos cánceres	Receptor de EGF
	IS-IL-2	Diversos cánceres	Ep-CAM
Millennium	Campath (alemtuzumab)	Leucemia linfocítica crónica	CD52
NeoRx	CD20-estreptavidina (+ biotina-itrio 90)	Linfoma no hodgkiniano	CD20
	Avidicin (albúmina + NRLU13)	Cáncer metastásico	NA
Peregrine	Oncolym (+ yodo-131)	Linfoma no hodgkiniano	HLA-DR 10 beta

	Cotara (+ yodo-131)	Glioma maligno irresecable	Proteínas asociadas a ADN
Pharmacia Corporation	C215 (+ enterotoxina de estafilococos)	Cáncer pancreático	NA
	MAB, cáncer pulmonar/renal	Cáncer pulmonar y renal	NA
	nacolumab tafenatox (C242 + enterotoxina de estafilococos)	Cáncer de colon y pancreático	NA
Protein Design Labs	Nuvion	Neoplasias de linfocitos T	CD3
	SMART M195	AML	CD33
	SMART 1D10	NHL	Antígeno HLA-DR
Titan	CEAVac	Cáncer colorrectal, avanzado	CEA
	TriGem	Melanoma metastásico y cáncer pulmonar microcítico	Gangliósido GD2
	TriAb	Cáncer de mama metastásico	MUC-1
Trilex	CEAVac	Cáncer colorrectal, avanzado	CEA
	TriGem	Melanoma metastásico y cáncer pulmonar microcítico	Gangliósido GD2
	TriAb	Cáncer de mama metastásico	MUC-1
Viventia Biotech	NovoMAB-G2 radiomarcado	Linfoma no hodgkiniano	NA
	Monopharm C	Carcinoma colorrectal y pancreático	Antígeno SK-1
	GlioMAB-H (+ toxina gelonina)	Glioma, melanoma y neuroblastoma	NA
Xoma	Rituxan	NHL de bajo grado o folicular recidivante/resistente	CD20
	Rituxan	NHL intermedio y de alto grado	CD20
	ING-1	Adenocarcinoma	Ep-CAM

5.7.2 Agentes inmunomoduladores y agentes antiinflamatorios

También se describen métodos de tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y de enfermedades inflamatorias que comprenden la administración de las moléculas de la divulgación junto con otros agentes de tratamiento.

- 5 Ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, aunque sin limitación, metotrexato, ENBREL, REMICADE™, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A y antibióticos macrólidos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticoesteroides, esteroides, micofenolato de mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxispermigualina, brequinar, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunamida), moduladores del receptor de linfocitos T y moduladores del receptor de citocinas.
- 10 Los agentes antiinflamatorios han mostrado éxito en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, y ahora son un tratamiento común y convencional para dichos trastornos. En los métodos descritos en la presente memoria puede usarse cualquier agente antiinflamatorio bien conocido por el experto en la materia. Ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, agonistas beta, agentes anticolinérgicos y metilxantinas. Ejemplos de AINE incluyen,
- 15 aunque sin limitación, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN™), etodolaco (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralaco (TORADOL™), oxaprozina

(DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindaco (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Dichos AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, la COX-1 y/o la COX-2). Ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, aunque sin limitación, glucocorticoesteroides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina y eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

Un ejemplo no limitante de los anticuerpos que pueden usarse para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios junto con las moléculas de la divulgación se presenta en la tabla 9, y un ejemplo no limitante de los anticuerpos que pueden usarse para el tratamiento o la prevención de un trastorno autoinmunitario se presenta en la tabla 10.

Tabla 9: Anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias

Nombre de anticuerpo	Antígeno diana	Tipo de producto	Isotipo	Patrocinadores	Indicación
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Artritis reumatoide
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Nefritis
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Derivación cardiopulmonar
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Infarto de miocardio
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastia
ABX-CBL	CBL	Humano		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	Murino	IgG	Abgenix Inc	Rechazo de aloinjerto
ABX-IL8	IL-8	Humano	IgG2	Abgenix Inc	Psoriasis
Antegren	VLA-4	Humanizado	IgG	Athena/Elan	Esclerosis múltiple
Anti-CD11a	CD11a	Humanizado	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Psoriasis
Anti-CD18	CD18	Humanizado	Fab'2	Genentech Inc	Infarto de miocardio
Anti-LFA1	CD18	Murino	Fab'2	Pasteur-Merieux/Immunotech	Rechazo de aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	Rechazo de aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	SLE
BTI-322	CD2	Rata	IgG	Medimmune Inc	GvHD, psoriasis
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Enfermedad de Crohn
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Artritis reumatoide
CDP850	E-selectina	Humanizado		Celltech	Psoriasis
Corsevin M	Factor VII	Quimérico		Centocor	Anticoagulante

D2E7	TNF-alfa	Humano		CAT/BASF	Artritis reumatoide
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Esclerosis múltiple
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado	IgG	ICOS Pharm Inc	Apoplejía
IC14	CD14			ICOS Pharm Inc	Choque tóxico
ICM3	ICAM-3	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Psoriasis
IDEC-114	CD80	Primatizado		IDEC Pharm/Mitsubishi	Psoriasis
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	SLE
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	Esclerosis múltiple
IDEC-151	CD4	Primatizado	IgG1	IDEC Pharm/Glaxo SmithKline	Artritis reumatoide
IDEC-152	CD23	Primatizado		IDEC Pharm	Asma/alergia
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Artritis reumatoide
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Enfermedad de Crohn
LDP-01	beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Apoplejía
LDP-01	beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Rechazo de aloinjerto
LDP-02	alfa4beta7	Humanizado		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Colitis ulcerosa
MAK-195F	TNF alfa	Murino	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	Choque tóxico
MDX-33	CD64 (FcR)	Humano		Medarex/Centeon	Trastornos hemáticos autoinmunitarios
MDX-CD4	CD4	Humano	IgG	Medarex/Eisai/Genmab	Artritis reumatoide
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	Psoriasis
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjerto
OrthoClone OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Enfermedad autoinmunitaria
Orthoclone/anti-CD3 OKT3	CD3	Murino	mIgG2a	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjerto
RepPro/Abciximab	gpIIbIIIa	Quimérico	Fab	Centocor/Lilly	Complicaciones de angioplastia coronaria
rhuMab-E25	IgE	Humanizado	IgG1	Genentech/Novartis/Tanox Biosystems	Asma/alergia
SB-240563	IL5	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/alergia
SB-240683	IL-4	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/alergia
SCH55700	IL-5	Humanizado		Celltech/Schering	Asma/alergia

Simulect	CD25	Quimérico	IgG1	Novartis Pharm	Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Enfermedad autoinmunitaria
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado	IgG	Protein Design Lab	Psoriasis
Zenapax	CD25	Humanizado	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman-La Roche	Rechazo de aloinjerto

Tabla 10: Anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
ABX-RB2		Anticuerpo contra antígeno CBL en linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK anticuerpo completamente humano de Xenomouse
5c8 (anticuerpo antiantígeno CD-40)	Ensayos en fase II se detuvieron en oct. 99, examinar "acontecimientos adversos"	CD-40
IDEC 131	Lupus eritematoso diseminado (SLE)	Anti-CD40 humanizado
IDEC 151	Artritis reumatoide	Primatizado; anti-CD4
IDEC 152	Asma	Primatizado; anti-CD23
IDEC 114	Psoriasis	Primatizado anti-CD80
MEDI-507	Artritis reumatoide; esclerosis múltiple; enfermedad de Crohn; psoriasis	Anti-CD2
LDP-02 (mAb anti-b7)	Enfermedad inflamatoria intestinal; enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa	Receptor de integrina $\alpha 4\beta 7$ en glóbulos blancos (leucocitos)
SMART anticuerpo antiinterferón gamma	Trastornos autoinmunitarios	Antiinterferón gamma
Verteportin	Artritis reumatoide	
MDX-33	Trastornos sanguíneos causados por reacciones autoinmunitarias Púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) Anemia hemolítica autoinmunitaria	Anticuerpo monoclonal contra receptores FcRI
MDX-CD4	Trata artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunitarias	Anticuerpo monoclonal contra molécula receptora de CD4
VX-497	Trastornos autoinmunitarios Esclerosis múltiple Artritis reumatoide Enfermedad inflamatoria intestinal Lupus Psoriasis	Inhibidor de la inosita monofosfato deshidrogenasa (enzima necesaria para generar nuevo ARN o ADN usado en la producción de nucleótidos necesarios para la proliferación de linfocitos)
VX-740	Artritis reumatoide	Inhibidor de ICE interleucina-1 beta (la enzima conversora controla las rutas que dan lugar a respuesta

		inmunitaria agresiva)
VX-745	Específico para inflamación implicada en señalización química de aparición de respuesta inmunitaria y progresión de inflamación	Inhibidor de proteína cinasa activada por mitógenos P38MAP cinasa
Enbrel (etanercept)		Dianas TNF (factor de necrosis tumoral)
IL-8		Anticuerpo monoclonal completamente contra IL-8 (interleucina 8)
Apogen MP4		Antígeno recombinante destruye selectivamente linfocitos T asociados a enfermedad induce apoptosis de linfocitos T eliminados por muerte celular programada ya no atacan a las propias células del organismo Apógenos específicos dirigidos a linfocitos T específicos

5.7.3 Agentes para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa

- Las moléculas de la divulgación pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o de agentes terapéuticos adicionales conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa. También se describe el uso de las moléculas de la divulgación en combinación con antibióticos conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento y o la prevención de una enfermedad infecciosa. Antibióticos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la divulgación incluyen, aunque sin limitación, un macrólido (por ejemplo, tobramicina (Tobi®)), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina (Keflex®), cefradina (Velosef®), cefuroxima (Ceftin®), cefprozilo (Cefzil®), cefaclor (Ceclor®), cefixima (Suprax®) o cefadroxilo (Duriccf®)), una claritromicina (por ejemplo, claritromicina (Biaxin®)), una eritromicina (por ejemplo, eritromicina (EMycin®)), una penicilina (por ejemplo, penicilina V (V-Cillin K® o Pen Vee K®)) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacino (Floxin®), ciprofloxacino (Cipro®) o norfloxacino (Noroxin®)), antibióticos aminoglucósidos (por ejemplo, apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, neomicina, neomicina, undecilenato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina y espectinomycin), antibióticos anfenícolos (por ejemplo, azidanfenicol, cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol), antibióticos ansamícinas (por ejemplo, rifamida y rifampina), carbacefems (por ejemplo, loracarbef), carbapenems (por ejemplo, biapenem e imipenem), cefalosporinas (por ejemplo, cefaclor, cefadroxilo, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, cefozopran, cefpimizol, cefpiramida y cefpiroma), cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazona, cefmetazol y cefminox), monobactams (por ejemplo, aztreonam, carumonam y tigemonam), oxacefems (por ejemplo, flomoxef y moxalactama), penicilinas (por ejemplo, amdinocilina, amdinocilina pivoxilo, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina sódica, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamciclina, yodhidruro de penetamato, penicilina o-benetamina, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepiciclina y fencihicilina potásica), lincosamidas (por ejemplo, clindamicina y lincomicina), amfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidina, enviomicina, tetraciclinas (por ejemplo, apiciclina, clortetraciclina, clomociclina y demeclociclina), 2,4-diaminopirimidinas (por ejemplo, brodimoprim), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona y cloruro de furazolio), quinolonas y análogos de las mismas (por ejemplo, cinoxacino, clinafloxacino, flumequina y grepagtoxacino), sulfonamidas (por ejemplo, acetil sulfametoxipirazina, bencilsulfamida, noprilsulfamida, ftalilsulfacetamida, sulfacrisoidina y sulfacitina), sulfonas (por ejemplo, diatimosulfona, glucosulfona sódica y solasulfona), cicloserina, mupirocina y tuberina.
- Las moléculas de la divulgación pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antifúngicos. Agentes antifúngicos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la divulgación incluyen, aunque sin limitación, anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, fluconazol, intratecal, flucitosina, miconazol, butoconazol, clotrimazol, nistatina, terconazol, tioconazol, ciclopirox, econazol, haloprogrin, naftifina, terbinafina, undecilenato y griseofulmina.
- Las moléculas de la divulgación pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antivíricos. Agentes antivíricos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la divulgación incluyen, aunque sin limitación, inhibidores de la proteasa, inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa y análogos de nucleósidos. Ejemplos de agentes antivíricos incluyen, aunque sin limitación, zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina, así como foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, los interferones alfa; adefovir, clevadina, entecavir, pleconaril.

5.8 Tratamiento de vacuna

También se describe el uso de una composición de la divulgación para inducir una respuesta inmunitaria frente a un agente antigénico o inmunogénico que incluye, aunque sin limitación, oncoantígenos y antígenos de enfermedades infecciosas (cuyos ejemplos se divulgan *infra*). Las composiciones de vacuna comprenden uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos contra los que se desea una respuesta inmunitaria, en las que el uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos están recubiertos con un anticuerpo variante descrito en la presente memoria que tiene una afinidad potenciada por el FcγRIIIA. Las composiciones de vacuna descritas en la presente memoria son particularmente eficaces para desencadenar una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria protectora contra el agente antigénico o inmunogénico.

En algunas realizaciones, el agente antigénico o inmunogénico de las composiciones de vacuna descritas en la presente memoria comprende un virus contra el que se desea una respuesta inmunitaria. Los virus pueden ser recombinantes o quiméricos, y preferiblemente están atenuados. La producción de virus recombinantes, quiméricos y atenuados puede llevarse a cabo usando métodos convencionales conocidos por un experto en la materia. También se describe una vacuna recombinante de virus vivos o una vacuna recombinante de virus inactivados que se va a formular como se describe en la presente memoria. Puede preferirse una vacuna de virus vivos debido a que la multiplicación en el hospedador da lugar a un estímulo prolongado de un tipo y una magnitud similar al que se produce en las infecciones naturales, y por lo tanto confiere una inmunidad duradera sustancial. La producción de dichas formulaciones de vacuna recombinantes de virus vivos puede llevarse a cabo usando métodos convencionales que implican la propagación del virus en un cultivo celular o en la alantoides de embrión de pollo, seguido de purificación.

En una realización específica, el virus recombinante no es patógeno para el sujeto al que se le va a administrar. A este respecto, el uso de virus modificados genéticamente con propósitos de vacuna puede requerir la presencia de unas características de atenuación en estas cepas. La introducción de las mutaciones apropiadas (por ejemplo, eliminaciones) en los moldes usados para la transfección puede proporcionar a los nuevos virus unas características de atenuación. Por ejemplo, pueden realizarse mutaciones específicas sin sentido que están asociadas con una sensibilidad a la temperatura o una adaptación al frío en unas mutaciones por eliminación. Estas mutaciones deberían ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas con los mutantes sensibles al frío o a la temperatura, y las frecuencias de reversión deberían ser extremadamente bajas. Las tecnologías de ADN recombinante para la modificación de virus recombinantes son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las técnicas para la modificación de virus de ARN de hebra negativa son conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5166057.

Como alternativa, pueden construirse virus quiméricos con características "suicidas" para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmicas. Dichos virus solo experimentarían una o unas pocas rondas de replicación en el hospedador. Cuando se usa como vacuna, el virus recombinante debería experimentar unos ciclos de replicación limitados e inducir un nivel suficiente de respuesta inmunitaria, pero no iría más allá en el hospedador humano como para causar una enfermedad. Como alternativa, pueden formularse virus inactivados (destruidos). Las formulaciones de vacuna con virus inactivados pueden prepararse usando las técnicas convencionales para "destruir" los virus quiméricos. Las vacunas con virus inactivados están "muertas" en el sentido de que se ha destruido su infectividad. Idealmente, la infectividad del virus se destruye sin afectar a su inmunogenicidad. Para preparar vacunas con virus inactivados, puede cultivarse el virus quimérico en un cultivo celular o en la alantoides de embrión de pollo, purificarse mediante una ultracentrifugación zonal, inactivarse con formaldehído o β-propiolactona y combinarse.

En determinadas realizaciones, pueden modificarse en el virus epítomos completamente exógenos, incluyendo los antígenos derivados de patógenos víricos o no víricos, para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmicas. Por ejemplo, pueden modificarse los antígenos de virus no relacionados tales como el VIH (gp160, gp120, gp41), antígenos de parásitos (por ejemplo, malaria), antígenos bacterianos o fúngicos o antígenos tumorales, en la cepa atenuada.

Puede construirse prácticamente cualquier secuencia génica heteróloga en el virus quimérico para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmicas. Preferiblemente, las secuencias génicas heterólogas son fracciones y péptidos que actúan como modificadores de la respuesta biológica. Preferiblemente, los epítomos que inducen una respuesta inmunitaria protectora frente a cualquiera de una diversidad de patógenos, o los antígenos que se unen a los anticuerpos neutralizantes, se pueden expresar por, o como parte de, los virus quiméricos. Por ejemplo, las secuencias génicas heterólogas que se pueden construir en los virus quiméricos incluyen, aunque sin limitación, neuraminidasa de hemaglutinina de la gripe y la paragripe y glucoproteínas de fusión tales como los genes HN y F del PIV3 humano. En otra realización más, las secuencias génicas heterólogas que se pueden construir en los virus quiméricos incluyen aquellas que codifican proteínas con actividades inmunomoduladoras. Ejemplos de proteínas inmunomoduladoras incluyen, aunque sin limitación, citocinas, interferón de tipo 1, interferón gamma, factores estimuladores de colonias, interleucina 1, 2, 4, 5, 6, 12 y los antagonistas de estos agentes.

También se describen células o virus patógenos, preferiblemente virus atenuados, que expresan el anticuerpo variante en su superficie.

Las composiciones de vacuna comprenden un polipéptido de fusión en el que un agente antigénico o inmunogénico está unido de forma funcional a un anticuerpo variante descrito en la presente memoria que tiene una afinidad potenciada por el FcγRIIIA. Los polipéptidos de fusión modificados para su uso en las composiciones de vacuna se crean usando métodos rutinarios de la tecnología del ADN recombinante, y pertenecen a las habilidades habituales.

También se describen métodos para inducir tolerancia en un sujeto mediante la administración de una composición. Preferiblemente, una composición adecuada para la inducción de tolerancia en un sujeto comprende un agente antigénico o inmunogénico recubierto con un anticuerpo variante descrito en la presente memoria, en el que el anticuerpo variante tiene una afinidad mayor por el FcγRIIB. Aunque sin pretender estar ligados a ningún mecanismo de acción en particular, dichas composiciones son eficaces en la inducción de tolerancia mediante la activación de la ruta inhibidora mediada por el FcγRIIB.

5.9 Composiciones y métodos de administración

La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de la divulgación (es decir, diacuerpos) que comprenden múltiples dominios de unión a epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo). También se describen métodos de tratamiento, profilaxis y mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, un trastorno o una infección mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una proteína de fusión o de una molécula conjugada de la divulgación, o de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o una molécula conjugada de la divulgación. En un aspecto preferido, un anticuerpo, una proteína de fusión o una molécula conjugada está sustancialmente purificado (es decir, sustancialmente exento de sustancias que limiten su efecto o que produzcan efectos secundarios indeseados). En una realización específica, el sujeto es un animal, preferiblemente un mamífero, tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, un mono, tal como un mono cangrejero, y un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. En otra realización preferida más, el anticuerpo es de la misma especie que el sujeto.

Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar una composición que comprende moléculas de la divulgación, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que pueden expresar el anticuerpo o la proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432), la construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro vector, etc. Métodos de administración de una molécula de la divulgación incluyen, aunque sin limitación, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, por las vías intranasal y oral). En una realización específica, las moléculas de la divulgación se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante una infusión o una inyección en bolo, mediante su absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, la mucosa oral, la mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otro agente biológicamente activo. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede emplearse una administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o de un nebulizador y de una formulación con un agente aerosolizante. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6019968; 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540; y 4880078; y las publicaciones PCT n.º WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903.

Las moléculas de la divulgación pueden envasarse en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o un sobrecito que indica la cantidad de anticuerpo. Las moléculas de la divulgación se suministran en forma de un polvo liofilizado esterilizado seco o de un concentrado exento de agua en un recipiente sellado herméticamente y se pueden reconstituir, por ejemplo, con agua o con una disolución salina a la concentración apropiada para su administración a un sujeto. Preferiblemente, las moléculas de la divulgación se suministran en forma de un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente sellado herméticamente a una dosis unitaria de al menos 5 mg, más preferiblemente de al menos 10 mg, de al menos 15 mg, de al menos 25 mg, de al menos 35 mg, de al menos 45 mg, de al menos 50 mg o de al menos 75 mg. Las moléculas liofilizadas de la divulgación se deben almacenar a entre 2 y 8 °C en su recipiente original, y las moléculas deben administrarse en las 12 horas, preferiblemente en las 6 horas, en las 5 horas, en las 3 horas o en 1 hora después de haberlas reconstituido. En una realización alternativa, las moléculas de la divulgación se suministran en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente que indica la cantidad y la concentración de la molécula, de la proteína de fusión o de la molécula conjugada. Preferiblemente, la forma líquida de las moléculas de la divulgación se suministran en un recipiente sellado herméticamente con al menos 1 mg/ml, más preferiblemente con al menos 2,5 mg/ml, con al menos 5 mg/ml, con al menos 8 mg/ml, con al menos 10 mg/ml, con al menos 15 mg/kg, con al menos 25 mg/ml, con al menos 50 mg/ml, con al menos 100 mg/ml, con al menos 150 mg/ml, con al menos 200 mg/ml de las moléculas.

La cantidad de la composición de la molécula de diacuerpo que será eficaz en el tratamiento, la prevención o la mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno se puede determinar mediante técnicas clínicas

convencionales. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la afección, y debería decidirse según el criterio del profesional y de las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas a partir de los sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos animales.

Para los diacuerpos englobados por la divulgación, la dosis administrada a un paciente es normalmente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosis administrada a un paciente es entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, entre 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, entre 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, entre 0,0001 y 2 mg/kg, entre 0,0001 y 1 mg/kg, entre 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, entre 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, entre 0,0001 mg/kg y 0,25 mg/kg, entre 0,0001 y 0,15 mg/kg, entre 0,0001 y 0,10 mg/kg, entre 0,001 y 0,5 mg/kg, entre 0,01 y 0,25 mg/kg o entre 0,01 y 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis y la frecuencia de administración de los diacuerpos de la divulgación se puede reducir o alterar potenciando la captación y la penetración tisular de los diacuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

En una realización, las dosis de las moléculas de la divulgación administradas a un paciente son de 0,01 mg a 1000 mg/día, cuando se usan en forma de un agente de monoterapia. En otra realización, las moléculas de la divulgación se usan en combinación con otras composiciones terapéuticas, y las dosis administradas a un paciente son menores que cuando dichas moléculas se usan en forma de un agente de monoterapia.

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas localmente en la zona en necesidad de tratamiento; esto puede conseguirse, por ejemplo y en modo alguno como limitación, mediante infusión local, mediante inyección o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferiblemente, cuando se administra una molécula de la divulgación, debe tenerse cuidado en usar materiales en los que no se absorba la molécula.

En otra realización, las composiciones se pueden administrar en una vesícula, en particular en un liposoma (véase, Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533); Treat et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (ed.), Liss, Nueva York, pág. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pág. 3 17-327; véase en general *ibid.*).

En otra realización más, las composiciones pueden administrarse en un sistema de liberación controlada o de liberación mantenida. Puede usarse cualquier técnica conocida por el experto en la materia para la producción de las formulaciones de liberación mantenida que comprenden una o más moléculas de la divulgación. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4526938; la publicación PCT WO 91/05548; la publicación PCT WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760. En una realización, puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlada (véase Langer, *supra*; Sefton, (1987) "Implantable Pumps," CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis," Surgery 88:507-516; y Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery," N. Engl. J. Med. 321:574-579). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos para conseguir la liberación controlada de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (ed.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (ed.), Wiley, Nueva York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate," Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization," Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits," J. Neurosurg. 7(1):105-112; la patente de Estados Unidos n.º 5679377; la patente de Estados Unidos n.º 5916597; la patente de Estados Unidos n.º 5912015; la patente de Estados Unidos n.º 5989463; la patente de Estados Unidos n.º 5128326; la publicación PCT n.º WO 99/15154; y la publicación PCT n.º WO 99/20253). Ejemplos de los polímeros usados en las formulaciones de liberación mantenida incluyen, aunque sin limitación, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etilen-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PEG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PEA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En otra realización más, puede colocarse un sistema de liberación controlada en las proximidades del agente terapéutico (por ejemplo, en los pulmones), y por tanto se requiere únicamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pág. 115-138 (1984)). En otra realización, se usan las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada de acuerdo con Dunn *et al.* (véase el documento U.S. 5945155). Este método particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada *in situ* del material bioactivo desde el sistema polimérico. La implantación puede producirse generalmente en cualquier parte del cuerpo del paciente que necesita tratamiento terapéutico. En otra realización, se

usa un sistema de administración mantenida no polimérico mediante el que se usa un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto como sistema de administración de fármacos. Tras su implantación en el cuerpo, el disolvente orgánico del implante se disipará, se dispersará o lixiviará desde la composición hacia el líquido tisular circundante, y el material no polimérico coagulará o precipitará gradualmente para formar una matriz microporosa sólida (véase el documento U.S. 5888533).

Los sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por el experto en la materia para la producción de formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4526938; las publicaciones internacionales n.º WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

Cuando la composición es un ácido nucleico que codifica un diacuerpo de la invención, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su diacuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión del ácido nucleico apropiado y administrándolo de forma que se haga intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la patente de Estados Unidos n.º 4980286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o un recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o con agentes de transfección, o mediante su administración unido a un péptido de tipo homeosecuencia que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot *et al.*, (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Como alternativa, puede introducirse un ácido nucleico intracelularmente e incorporarse en el ADN de la célula hospedadora para su expresión mediante recombinación homóloga.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de moléculas de la divulgación puede incluir un único tratamiento, o preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, se trata un sujeto con las moléculas de la divulgación en el intervalo entre aproximadamente 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferiblemente durante entre 2 y 8 semanas, más preferiblemente durante entre aproximadamente 3 y 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran una vez por semana, dos veces por semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosis eficaz de las moléculas usadas para el tratamiento puede aumentarse o disminuirse durante el transcurso de un tratamiento particular.

5.9.1 Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de la divulgación incluyen composiciones de fármacos a granel útiles en la elaboración de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para su administración a un sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitarias. Dichas composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico divulgado en la presente memoria o una combinación de esos agentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las composiciones de la divulgación comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La divulgación también abarca composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de diacuerpo de la divulgación y un anticuerpo terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico tumoral) que es específico para un oncoantígeno particular, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por un organismo regulador del gobierno federal o estatal, o recogido en la Farmacopea de los Estados Unidos o en otra Farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, a un adyuvante (por ejemplo, el adyuvante de Freund (completo e incompleto), a un excipiente o a un vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse disoluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de

sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Si se desea, la composición también puede contener cantidades mínimas de agentes humectantes o emulsionantes, o de agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación mantenida y similares.

- 5 En general, los ingredientes de las composiciones de la divulgación se suministran por separado o se mezclan entre sí en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado seco o un concentrado exento de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o un sobrecito que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar mediante una infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene agua o disolución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se
- 10 administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua o de una disolución salina estéril para inyección, de forma que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

Las composiciones de la divulgación pueden formularse como formas neutras o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitación, las formadas con aniones tales como las obtenidas a partir de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y las formadas con cationes tales como las obtenidas a partir de

15 sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

5.9.2 Genoterapia

- Los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican moléculas de la divulgación, se administran para el tratamiento, la prevención o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, un trastorno o una
- 20 infección, a modo de genoterapia. La genoterapia se refiere al tratamiento que se realiza mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo o proteína de fusión codificado que media en un efecto terapéutico o profiláctico.

Pueden usarse cualquiera de los métodos de genoterapia disponibles en la técnica. A continuación, se describen métodos ejemplares.

- 25 Para revisiones generales de los métodos de genoterapia, véase Goldspiel et al. (1993) "Human Gene Therapy," *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu et al. (1991) "Delivery Systems For Gene Therapy," *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev (1993) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions," *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan (1993) "The Basic Science Of Gene Therapy," *Science* 260:926-932; y Morgan et al. (1993) "Human Gene Therapy," *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217. Métodos conocidos habitualmente en la técnica de la
- 30 tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel *et al.* (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990).

- Una composición descrita en la presente memoria puede comprender ácidos nucleicos que codifican un diacuerpo de la divulgación, siendo dichos ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un
- 35 hospedador adecuado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, unidos de forma funcional a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico tisular. En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en que las secuencias codificantes del anticuerpo y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por las regiones que promueven la recombinación homóloga en el sitio deseado del genoma, proporcionando así la
- 40 expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller et al. (1989) "Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935; y Zijlstra et al. (1989) "Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2-Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells," *Nature* 342:435-438).

- Una composición descrita en la presente memoria puede comprender ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión, siendo dichos ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa la proteína de fusión en un
- 45 hospedador adecuado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, unidos de forma funcional a la región codificante de una proteína de fusión, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y opcionalmente, específico tisular. En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en que las secuencias codificantes de la proteína de fusión y cualquier otra secuencia deseada están
- 50 flanqueadas por las regiones que promueven la recombinación homóloga en el sitio deseado del genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de la proteína de fusión.

- La administración de los ácidos nucleicos a un sujeto puede ser directa, en cuyo caso el sujeto se expone directamente al ácido nucleico o a los vectores portadores del ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso las células se transforman en primer lugar con los ácidos nucleicos *in vitro*, después se trasplantan al sujeto. Estas dos estrategias
- 55 se conocen, respectivamente, como genoterapia *in vivo* o *ex vivo*.

En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico son administradas directamente *in vivo*, donde son expresadas para producir el producto codificado. Esto puede llevarse a cabo mediante cualquiera de numerosos

métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolos como parte de un vector de expresión del ácido nucleico adecuado y administrándolo de forma que se hagan intracelulares, por ejemplo, mediante infección usando retrovirus defectuosos o atenuados u otros vectores víricos (véase la patente de Estados Unidos n.º 4980286), o mediante inyección directa del ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo con micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o con receptores de la superficie celular o con agentes de transfección, encapsulación en liposomas, en micropartículas o en microcápsulas, o mediante su administración unidas a un péptido que se sabe que entra en el núcleo, mediante su administración unidas a un antígeno sometido a una endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem 262:4429-4432) (que puede usarse para los tipos de células diana que expresan específicamente los receptores), etc. En otra realización, pueden formarse complejos de ácido nucleico-antígeno en que el antígeno comprende un péptido vírico fusogénico para disociar los endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En otra realización más, el ácido nucleico se puede dirigir *in vivo* para una captación y una expresión celular específica, mediante su direccionamiento a un receptor específico (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; WO 93/14188; WO 93/20221). Como alternativa, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse en el ADN de la célula hospedadora para su expresión, mediante recombinación homóloga (Koller et al. (1989) "Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra et al. (1989) "Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2-Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells," Nature 342:435-438).

Se pueden usar vectores víricos que contienen las secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula de la divulgación (por ejemplo, un diacuerpo o una proteína de fusión). Por ejemplo, puede usarse un vector retroviral (véase, Miller et al. (1993) "Use Of Retroviral Vectors For Gene Transfer And Expression," Meth. Enzymol. 217:581-599). Estos vectores retrovíricos contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetamiento del genoma vírico y su integración en el ADN de la célula hospedadora. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo o una proteína de fusión que se va a usar en genoterapia se clonan en uno o más vectores, lo que facilita la administración de la secuencia de nucleótidos a un sujeto. Pueden encontrarse más detalles sobre los vectores retrovíricos en Boesen *et al.*, (1993) "Circumvention Of Chemotherapy-Induced Myelosuppression By Transfer Of The Mdr1 Gene," Biotherapy 6:291-302), que describe el uso de un vector retroviral para la administración del gen *mdr 1* a células madre hematopoyéticas para hacer que las células madre sean más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovíricos en genoterapia son: Clowes et al. (1994) "Long-Term Biological Response Of Injured Rat Carotid Artery Seeded With Smooth Muscle Cells Expressing Retrovirally Introduced Human Genes," J. Clin. Invest. 93:644-651; Keim et al. (1994) "Retrovirus-Mediated Gene Transduction Into Canine Peripheral Blood Repopulating Cells," Blood 83:1467-1473; Salmons et al. (1993) "Targeting Of Retroviral Vectors For Gene Therapy," Human Gene Therapy 4:129-141; y Grossman et al. (1993) "Retroviruses: Delivery Vehicle To The Liver," Curr. Opin. Genetics and Devel. 3:110-114.

Los adenovirus son otros vectores víricos que pueden usarse en genoterapia. Los adenovirus son unos vehículos especialmente atractivos para la administración de genes al epitelio respiratorio. Los adenovirus infectan de forma natural el epitelio respiratorio, donde causan una enfermedad leve. Otras dianas para los sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de poder infectar células que no se están dividiendo. Kozarsky et al. (1993, "Gene Therapy: Adenovirus Vectors," Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503), presentan una revisión de genoterapia basada en adenovirus. Bout et al. (1994, "Lung Gene Therapy: In Vivo Adenovirus-Mediated Gene Transfer To Rhesus Monkey Airway Epithelium," Human Gene Therapy, 5:3-10) muestran el uso de vectores de adenovirus para la transferencia de genes al epitelio respiratorio de macacos. Otros casos de uso de adenovirus en genoterapia pueden encontrarse en Rosenfeld et al. (1991) "Adenovirus-Mediated Transfer Of A Recombinant Alpha 1-Antitrypsin Gene To The Lung Epithelium In Vivo," Science 252:431-434; Rosenfeld et al. (1992) "In Vivo Transfer Of The Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene To The Airway Epithelium," Cell 68:143-155; Mastrangeli et al. (1993) "Diversity Of Airway Epithelial Cell Targets For In Vivo Recombinant Adenovirus-Mediated Gene Transfer," J. Clin. Invest. 91:225-234; publicación PCT WO 94/12649; y Wang et al. (1995) "A Packaging Cell Line For Propagation Of Recombinant Adenovirus Vectors Containing Two Lethal Gene-Region Deletions," Gene Therapy 2:775-783. En una realización preferida, se usan vectores de adenovirus.

También se han propuesto los virus adenoasociados (AAV) para su uso en genoterapia (véase, por ejemplo, Walsh et al. (1993) "Gene Therapy For Human Hemoglobinopathies," Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 y la patente de Estados Unidos n.º 5436146).

Otra estrategia de genoterapia implica la transferencia de un gen a las células de un cultivo tisular mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección vírica. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador de selección a las células. Después, las células se colocan bajo selección para aislar aquellas células que han captado y están expresando el gen transferido. Después, esas células se administran a un sujeto.

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica que incluye, aunque sin limitación, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector vírico o un bacteriófago que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por un cromosoma, transferencia génica mediada por una microcélula, fusión de esferoplastos, etc. En la técnica se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes exógenos en células (véase, por ejemplo, Loeffler et al. (1993) "Gene Transfer Into Primary And Established Mammalian Cell Lines With Lipopolyamine-Coated DNA," Meth. Enzymol. 217:599-618, Cotten et al. (1993) "Receptor-Mediated Transport Of DNA Into Eukaryotic Cells," Meth. Enzymol. 217:618-644) y pueden usarse con la condición de que no se alteren las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células destinatarias. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de forma que el ácido nucleico sea expresable por la célula, y preferiblemente heredable y expresable por su descendencia celular.

Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un sujeto mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Las células recombinantes sanguíneas (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas o progenitoras) se administran preferiblemente por vía intravenosa. La cantidad de células contemplada para su uso depende del efecto deseado, del estado del paciente, etc., y se puede determinarse por el experto en la materia.

Las células en que se puede introducir un ácido nucleico con propósitos de genoterapia engloban cualquier tipo de célula deseado disponible e incluyen, aunque sin limitación, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular, células madre hematopoyéticas o progenitoras, por ejemplo, según se obtienen a partir de la médula ósea, de la sangre del cordón umbilical, de sangre periférica, de hígado fetal, etc.

En una realización preferida, la célula usada para genoterapia es autóloga al sujeto.

En una realización en la que se usan células recombinantes en genoterapia, las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión se introducen en las células de forma que sean expresables por las células o por su descendencia, y después las células recombinantes se administran *in vivo* para su efecto terapéutico. En una realización específica, se usan células madre o células progenitoras. Potencialmente puede usarse cualquier célula madre y/o progenitora que se pueda aislar y mantener *in vitro* (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/08598; Stemple et al. (1992) "Isolation Of A Stem Cell For Neurons And Glia From The Mammalian Neural Crest," Cell 71:973-985; Rheinwald (1980) "Serial Cultivation Of Normal Human Epidermal Keratinocytes," Meth. Cell Bio. 21A:229-254; y Pittelkow et al. (1986) "New Techniques For The In Vitro Culture Of Human Skin Keratinocytes And Perspectives On Their Use For Grafting Of Patients With Extensive Burns," Mayo Clinic Proc. 61:771-777).

En una realización específica, el ácido nucleico a introducir con propósitos de genoterapia comprende un promotor inducible unido de forma funcional a la región codificante, de forma que la expresión del ácido nucleico sea controlable mediante el control de la presencia o de la ausencia del inductor apropiado de la transcripción.

5.9.3 Kits

También se describe un paquete o un kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes que contienen las moléculas de la divulgación. Adicionalmente, también puede incluirse uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad en el paquete o el kit farmacéutico. También se describe un paquete o un kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes que contienen uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria. Opcionalmente, asociado a dicho(s) recipiente(s) puede haber un prospecto en la forma prescrita por un organismo gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, prospecto que refleja la aprobación por parte del organismo de la fabricación, el uso o la venta para su administración a seres humanos.

También se describen kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende una o más moléculas de la divulgación. En otra realización, un kit comprende además uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más recipientes. En otra realización, un kit comprende además uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más oncoantígenos asociados con un cáncer. En determinadas realizaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente quimioterápico. En otras realizaciones, el agente profiláctico o terapéutico es una sustancia terapéutica biológica u hormonal.

5.10 Caracterización y demostración de la utilidad terapéutica

Varios aspectos de las composiciones farmacéuticas, de los agentes profilácticos o terapéuticos descritos en la presente memoria se ensayan preferiblemente *in vitro*, en un sistema de cultivo celular y en un organismo de un modelo animal, tal como un sistema de modelo animal de roedor, para analizar la actividad terapéutica deseada antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, algunos ensayos que pueden usarse para determinar si se desea la administración de una composición farmacéutica específica incluyen ensayos de cultivo celular en los que se

cultiva una muestra de tejido del paciente en un cultivo y se expone o se pone en contacto de otro modo con una composición farmacéutica descrita en la presente memoria y se observa el efecto de dicha composición sobre la muestra de tejido. La muestra de tejido puede obtenerse mediante una biopsia del paciente. Este ensayo permite la identificación de la(s) molécula(s) profilácticas o terapéuticas terapéuticamente más eficaces para cada paciente individual. En varias realizaciones específicas pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de los tipos celulares individuales implicados en un trastorno autoinmunitario o inflamatorio (por ejemplo, linfocitos T), para determinar si una composición farmacéutica descrita en la presente memoria tiene un efecto deseado sobre dicho tipo celular.

Pueden ensayarse combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en sistemas de modelos animales adecuados antes de su uso en seres humanos. Dichos sistemas de modelo animal incluyen, aunque sin limitación, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede usarse cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. Pueden ensayarse combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en un sistema de modelo de ratón. Dichos sistemas de modelo son ampliamente usados y bien conocidos por los expertos. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos se pueden administrar repetidamente. Varios aspectos del procedimiento pueden variar. Dichos aspectos incluyen la pauta temporal de administración de los agentes profilácticos y/o terapéuticos, y si dichos agentes se administran por separado o como una mezcla.

Modelos animales preferidos para su uso en los métodos descritos en la presente memoria son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan los FcγR humanos en células efectoras de ratón, por ejemplo, puede usarse cualquier modelo de ratón descrito en el documento U.S. 5877396. Los ratones transgénicos para su uso en los métodos incluyen, aunque sin limitación, ratones portadores del FcγRIIIA humano; ratones portadores del FcγRIIA humano; ratones portadores del FcγRIIB y del FcγRIIIA humano; ratones portadores del FcγRIIB y del FcγRIIA humano. Preferiblemente, se ensayarán las mutaciones que muestren los mayores niveles de actividad en los ensayos funcionales descritos anteriormente para su uso en los estudios con un modelo animal antes de su uso en seres humanos. Pueden prepararse cantidades suficientes de anticuerpos para su uso en los modelos animales usando los métodos descritos *supra*, por ejemplo, usando sistemas de expresión de mamífero y los métodos de purificación divulgados y ejemplificados en la presente memoria.

Pueden usarse modelos de xenoinjerto de ratón para el análisis de la eficacia de los anticuerpos de ratón generados contra una diana tumoral específica basándose en la afinidad y en la especificidad de los dominios de unión a epítipo de la molécula de diacuerpo de la divulgación, y en la capacidad del diacuerpo de desencadenar una respuesta inmunitaria (Wu et al. (2001) "Mouse Models For Multistep Tumorigenesis," Trends Cell Biol. 11: S2-9). Los ratones transgénicos que expresan los FcγR humanos en células efectoras de ratón son modelos animales hechos a medida para ensayar la eficacia de las interacciones de Fc-FcγR humano. Pueden usarse pares de líneas de ratón transgénicas de FcγRIIIA, FcγRIIB y FcγRIIA generadas en el laboratorio del Dr. Jeffrey Ravetch (a través de un acuerdo de licencia con la Rockefeller U. y el Sloan Kettering Cancer center), tales como las enumeradas en la siguiente tabla 11.

Tabla 11: Cepas de ratón

Cepa de fondo	FcR humano
Atímico/CD16A KO	Ninguno
Atímico/CD16A KO	FcγRIIIA
Atímico/CD16A KO	FcγRIIA
Atímico/CD16A KO	FcγRIIA y IIIA
Atímico/CD32B KO	Ninguno
Atímico/CD32B KO	FcγRIIB

La actividad antiinflamatoria de los tratamientos de combinación se puede determinar mediante el uso de varios modelos animales experimentales de artritis inflamatoria conocidos en la técnica y descritos en Crofford L. J. y Wilder R. L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty et al. (ed.), capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). También pueden usarse modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y de enfermedades reumáticas autoinmunitarias para evaluar la actividad antiinflamatoria de los tratamientos de combinación. Los siguientes son algunos ensayos proporcionados como ejemplos, y no como limitación.

Los principales modelos animales de artritis o de enfermedad inflamatoria conocidos en la técnica y ampliamente usados incluyen: modelos de rata de artritis inducida por un adyuvante, modelos de rata y de ratón de artritis

inducida por colágeno, y modelos de rata, de conejo y de hámster de artritis inducida por un antígeno, todos descritos en Crofford L. J. y Wilder R. L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty *et al.* (ed.), capítulo 30 (Lee y Lebigier, 1993).

La actividad antiinflamatoria de los tratamientos de combinación puede evaluarse usando un modelo de rata de artritis inducida por carragenina. La artritis inducida por carragenina también se ha usado en conejos, perros y cerdos en estudios de artritis crónica o de inflamación. Se usa una evaluación histomorfométrica cuantitativa para determinar la eficacia terapéutica. Los métodos que usan dicho modelo de artritis inducida por carragenina se describen en Hansra P. *et al.*, (2000) "Carrageenan-Induced Arthritis in the Rat", *Inflammation*, 24 (2): 141-155. También se usan habitualmente modelos animales de inflamación inducida por zimosano, como se sabe y se describe en la técnica.

La actividad antiinflamatoria de los tratamientos de combinación también puede evaluarse midiendo la inhibición del edema en una pata inducido por carragenina en ratas, usando una modificación del método descrito en Winter C. A. *et al.*, (1962) "Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs" *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 111, 544-547. Este ensayo se ha usado como un cribado principal *in vivo* de la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los AINE y se considera predictivo de la eficacia en seres humanos. La actividad antiinflamatoria de los agentes profilácticos o terapéuticos de ensayo se expresa como el porcentaje de inhibición del aumento en el peso de la pata posterior del grupo de ensayo con respecto al grupo de control al que se le ha administrado vehículo.

Adicionalmente, también pueden usarse modelos animales de enfermedad inflamatoria del intestino para evaluar la eficacia de los tratamientos de combinación (Kim *et al.*, (1992), "Experimental Colitis In Animal Models," *Scand. J. Gastroenterol.* 27:529-537; Strober (1985) "Animal Models Of Inflammatory Bowel Disease--An Overview," *Dig. Dis. Sci.* 30(12 Supl.):3S-10S). La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son enfermedades inflamatorias del intestino humanas que pueden inducirse en animales. Pueden administrarse polisacáridos que incluyen, aunque sin limitación, amilopectina, carragenina, sulfato de amilopectina y sulfato de dextrano, o productos químicos irritantes que incluyen, aunque sin limitación, ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) y ácido acético a los animales por vía oral, para inducir enfermedades inflamatorias del intestino.

También pueden usarse modelos animales de trastornos autoinmunitarios para evaluar la eficacia de los tratamientos de combinación. Se han desarrollado modelos animales para trastornos autoinmunitarios tales como la diabetes de tipo 1, la autoinmunidad tiroidea, el lupus eritematoso sistémico y la glomerulonefritis (Flanders *et al.*, (1999) "Prevention Of Type 1 Diabetes From Laboratory To Public Health," *Autoimmunity* 29:235-246; Rasmussen *et al.* (1999) "Models To Study The Pathogenesis Of Thyroid Autoimmunity," *Biochimie* 81:511-515; Foster (1999) "Relevance Of Systemic Lupus Erythematosus Nephritis Animal Models To Human Disease," *Semin. Nephrol.* 19:12-24).

Además, puede usarse cualquier ensayo conocido por los expertos en la materia para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de los tratamientos de combinación divulgados en la presente memoria para las enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias.

La toxicidad y la eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para la determinación de la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y de la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren los agentes profilácticos y/o terapéuticos que muestren unos índices terapéuticos grandes. Aunque pueden usarse agentes profilácticos y/o terapéuticos que muestren unos efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado en diseñar un sistema de administración que dirija dichos agentes al sitio de tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas, y reducir así los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos en cultivos celulares y en los estudios con animales pueden usarse en la formulación de un abanico de dosis de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para su uso en seres humanos. La dosis de dichos agentes está preferiblemente en un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar en este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en el método descrito en la presente memoria, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de los ensayos con cultivos celulares. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir una concentración plasmática en circulación que incluya la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) según se determina en el cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

La actividad antineoplásica de los tratamientos usados también puede determinarse mediante el uso de varios modelos animales experimentales para el estudio del cáncer, tales como el modelo de ratón SCID o de ratón

transgénico o de ratón atímico con xenoinjertos humanos, modelos animales, tales como hámsteres, conejos, etc. conocidos en la técnica y descritos en *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development* (1999, ed. Fiebig y Burger); *Contributions to Oncology* (1999, Karger); *The Nude Mouse in Oncology Research* (1991, ed. Boven y Winograd); y *Anticancer Drug Development Guide* (1997 ed. Teicher).

- 5 Modelos animales preferidos para la determinación de la eficacia terapéutica de las moléculas de la divulgación son modelos de xenoinjerto de ratón. Líneas celulares tumorales que pueden usarse como fuente para los xenoinjertos de tumores incluyen, aunque sin limitación, células SKBR3 y MCF7, que pueden proceder de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen receptores tanto erbB2 como de prolactina. Las células SKBR3 se han usado de forma rutinaria en la técnica como modelos de ADCC y de xenoinjerto de tumor. Como alternativa, pueden usarse células OVCAR3 derivadas de un adenocarcinoma de ovario humano como fuente para los xenoinjertos de tumores.

- 15 Los protocolos y las composiciones se ensayan preferiblemente *in vitro* y después *in vivo*, para evaluar la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en seres humanos. Los agentes y los métodos terapéuticos se pueden cribar usando células de un tumor o de una línea celular maligna. Pueden usarse muchos ensayos convencionales en la técnica para evaluar dicha supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse mediante la medición de la incorporación de ³H-timidina, mediante un recuento celular directo, mediante la detección de los cambios en la actividad de transcripción de genes conocidos tales como protooncogenes (por ejemplo, fos, myc) o de marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede evaluarse mediante una tinción con azul tripano, la diferenciación puede evaluarse visualmente basándose en los cambios en la morfología, en la disminución en el crecimiento y/o en la formación de colonias en agar blando o la formación de una red tubular en una membrana de base tridimensional o una preparación de matriz extracelular, etc.

- 20 Los compuestos para su uso en tratamiento se pueden ensayar en sistemas de modelo animal adecuados antes de ensayarlos en seres humanos, incluyendo, aunque sin limitación, en ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, hámsteres, etc., por ejemplo, los modelos animales descritos anteriormente. Después, los compuestos pueden usarse en los ensayos clínicos apropiados.

Además, puede usarse cualquier ensayo conocido por los expertos en la materia para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de los tratamientos de combinación divulgados en la presente memoria para el tratamiento o la prevención del cáncer, de un trastorno inflamatorio o de una enfermedad autoinmunitaria.

6. Ejemplos

- 30 6.1 Diseño y caracterización de diacuerpos biespecíficos covalentes

- Se construyó un diacuerpo monoespecífico covalente y un diacuerpo biespecífico covalente para evaluar la producción recombinante, la purificación y las características de unión de cada uno. Se encontró que las moléculas de diacuerpo purificadas por afinidad que se produjeron mediante los sistemas de expresión recombinante descritos en la presente memoria, mediante un análisis de SDS-PAGE y de SEC, consistían en especies dimericas individuales. Los análisis de ELISA y de SPR revelaron además que el diacuerpo biespecífico covalente mostraba afinidad por ambos antígenos diana y podía unirse simultáneamente a ambos antígenos.

Materiales y métodos:

- 40 Construcción y diseño de las moléculas polipeptídicas: se diseñaron vectores de expresión de ácidos nucleicos para producir cuatro construcciones polipeptídicas, representadas esquemáticamente en la figura 2. La construcción 1 (SEQ ID NO: 9) comprendía el dominio VL del anticuerpo 2B6 humanizado, que reconoce el FcγRIIB y el dominio VH del anticuerpo 3G8 humanizado, que reconoce el FcγRIIIA. La construcción 2 (SEQ ID NO: 11) comprendía el dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu2B6. La construcción 3 (SEQ ID NO: 12) comprendía el dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu3G8. La construcción 4 (SEQ ID NO: 13) comprendía el dominio VL de Hu2B6 y el dominio VH de Hu2B6.

- 45 PCR y construcción del vector de expresión: las secuencias codificantes de los dominios VL o VH se amplificaron a partir del ADN de molde usando cebadores directos e inversos diseñados de forma que los productos iniciales de la PCR contuvieran secuencias solapantes, permitiendo que la PCR solapante generara las secuencias codificantes de las construcciones polipeptídicas deseadas.

- 50 Amplificación inicial mediante PCR del ADN de molde: se mezclaron suavemente aproximadamente 35 ng del ADN de molde, por ejemplo, la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo de interés; 1 ul de los cebadores directo e inverso 10 uM; 2,5 ul de tampón pfuUltra 10x (Stratagene, Inc.); 1 ul de dNTP 10 mM; 1 ul de 2,5 unidades/ul de polimerasa de ADN pfuUltra (Stratagene, Inc.); y agua destilada hasta un volumen total de 25 ul, en un tubo de microcentrífuga, y se rotaron brevemente en una microcentrífuga para recoger la mezcla de reacción del fondo del tubo. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el sistema de PCR GeneAmp 9700 (PE Applied Biosystem) y los siguientes ajustes: 94 °C, 2 minutos; 25 ciclos de 94 °C, cada 15 segundos; 58 °C, 30 segundos; y 72 °C, 1 minuto.

El VL de Hu2B6 se amplificó a partir de la cadena ligera de Hu2B6 usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56, respectivamente. El VH de Hu2B6 se amplificó a partir de la cadena pesada de Hu2B6 usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, respectivamente. El VL de Hu3G8 se amplificó a partir de la cadena ligera de Hu3G8 usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 59, respectivamente. El VH de Hu3G8 se amplificó a partir de la cadena pesada de Hu3G8 usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61, respectivamente.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % durante 30 minutos a 120 voltios. Los productos de PCR se cortaron del gel y se purificaron usando el kit de extracción MinElute GE1 (Qiagen, Inc.).

PCR solapante: los productos iniciales de PCR se combinaron como se describe a continuación y se amplificaron usando las mismas condiciones de PCR descritas para la amplificación inicial del ADN de molde. Los productos de PCR solapante también se purificaron como se describe *supra*.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 1, SEQ ID NO: 9 (mostrada esquemáticamente en la figura 2), se amplificó mediante la combinación de los productos de la PCR de las amplificaciones del VL de Hu2B6 y del VH de Hu3G8 y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 61, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 2, SEQ ID NO: 11 (mostrada esquemáticamente en la figura 2), se amplificó mediante la combinación de los productos de PCR de las amplificaciones del VL de Hu3G8 y del VH de Hu2B6 y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 58, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 3, SEQ ID NO: 12 (mostrada esquemáticamente en la figura 2), se amplificó mediante la combinación de los productos de PCR de las amplificaciones del VL de Hu3G8 y del VH de Hu3G8, y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 61, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 4, SEQ ID NO: 13 (mostrada esquemáticamente en la figura 2), se amplificó mediante la combinación de los productos de PCR de las amplificaciones del VL de Hu2B6 y del VH de Hu2B6 y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 58, respectivamente.

Los cebadores directos de los dominios VL (es decir, SEQ ID NO: 55) y los cebadores inversos de los dominios VH (es decir, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 61) contenían sitios de restricción únicos para permitir la clonación del producto final en un vector de expresión. Los productos de PCR solapante purificados se digirieron con las endonucleasas de restricción Nhe I y EcoR I y se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.). Los plásmidos que codifican las construcciones se denominaron como se identifica en la tabla 12:

Tabla 12. Construcciones plasmídicas

Construcción codificante	Denominación del plásmido	Inserto
1	pMGX0669	hu2B6VL-hu3G8VH
2	pMGX0667	hu3G8VL-hu2B6VH
3	pMGX0666	hu3G8VL-hu3G8VH
4	pMGX0668	hu2B6VL-hu2B6VH

Expresión del polipéptido/diacuerpo: pMGX0669, que codifica la construcción 1, se cotransfectó con pMGX0667, que codifica la construcción 2, en células HEK-293 usando Lipofectamine 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La cotransfección de estos dos plásmidos estaba diseñada para que diera lugar a la expresión de un diacuerpo biespecífico covalente (CBD) inmuno-específico tanto para el FcγRIIB como para el FcγRIIA (diacuerpo h2B6-h3G8). pMGX0666 y pMGX0668, que codifican las construcciones 3 y 4, respectivamente, se transfectaron por separado en células HEK-293 para la expresión de un diacuerpo monoespecífico covalente (CMD), inmuno-específico para el FcγRIIA (diacuerpo h3G8) y para el FcγRIIB (diacuerpo h2B6), respectivamente. Después de tres días en el cultivo, los productos secretados se purificaron del medio acondicionado.

Purificación: los diacuerpos se capturaron del medio acondicionado usando los antígenos pertinentes acoplados a Sepharose 4B activada con CNBr. La resina de afinidad de Sepharose se equilibró en Tris/HCl 20 mM, pH de 8,0 antes de la carga. Después de la carga, la resina se lavó con tampón de equilibrado antes de la elución. Los diacuerpos eluyeron de la resina lavada usando glicina 50 mM pH de 3,0. Los diacuerpos eluidos se neutralizaron inmediatamente con Tris/HCl 1 M pH de 8,0 y se concentraron usando un concentrador de tipo centrifugación. Los diacuerpos concentrados se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex 200 equilibrada con PBS.

SEC: se usó cromatografía de exclusión molecular para analizar el tamaño aproximado y la heterogeneidad de los diacuerpos eluidos desde la columna. El análisis de SEC se llevó a cabo en una columna GE healthcare Superdex

200HR 10/30 equilibrada con PBS. La comparación con los perfiles de elución de una IgG de longitud completa (~ 150 kDa), de un fragmento Fab (~ 50 kDa) y de un Fv monocatenario (~ 30 kDa) se usaron como controles).

ELISA: la unión de los diacuerpos eluidos y purificados se caracterizó mediante un ensayo de ELISA, como se describe en 5.4.2. Se recubrieron 50 ul/pocillo de una disolución de 2 ug/ml de sCD32B-Ig en una placa de 96 pocillos Maxisorp en tampón de carbonato a 4 °C durante una noche. Se lavó tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1 %) y se bloqueó con BSA al 0,5 % en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se diluyeron el h2B6-h3G8 CBD, el h2B6 CMD o el h3G8 CMD en el tampón de bloqueo en diluciones dobles sucesivas para generar un abanico de concentraciones de diacuerpo, desde 0,5 ug/ml hasta 0,001 ug/ml. Después la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con PBS-T, se añadieron 50 ul/pocillo de sCD16A-biotina a 0,2 ug/ml a cada pocillo. La placa se incubó de nuevo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con PBS-T, se usaron 50 ul/pocillo de una dilución 1:5000 de estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) para la detección. La HRP-estreptavidina se dejó en incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con PBS-T y se reveló usando 80 ul/pocillo de sustrato TMB. Después de una incubación de 10 minutos, la reacción de HRP-TMB se detuvo mediante la adición de 40 ul/pocillo de H₂SO₄ al 1 %. Se leyó la DO 450 nm mediante el uso de un lector de placa de 96 pocillos y el programa informático SOFTmax, y los resultados se representaron gráficamente usando el programa informático GraphPadPrism 3.03.

Ensayo BIAcore: los parámetros cinéticos de la unión de los diacuerpos eluidos y purificados se analizaron usando un ensayo BIAcore (BIAcore instrument 1000, BIAcore Inc., Piscataway, N. J.) y el programa informático asociado como se describe en la sección 5.4.3.

Se inmovilizaron el sCD16A, el sCD32B o el sCD32A (control negativo) en una de las cuatro celdas de flujo (celda de flujo 2) de la superficie de un chip sensor a través de una química de acoplamiento de amina (mediante la modificación de los grupos carboximetilo con una mezcla de NHS/EDC) de forma que se inmovilizaron aproximadamente 1000 unidades de respuesta (UR) de cualquiera de los receptores en la superficie. Después de esto, los ésteres activos sin reaccionar se "inactivaron" con una inyección de Et-NH₂ 1 M. Una vez preparada una superficie adecuada, se pasaron los diacuerpos biespecíficos covalentes (CBD h2B6-h3G8) o los diacuerpos monoespecíficos covalentes (CMD h2B6 o CMB h3G8) por encima de la superficie mediante inyecciones de 180 segundos de una disolución 6,25-200 nM a un caudal de 70 ml/min. También se ensayó el scFv h3G8 como comparación.

Una vez recogido un conjunto total de datos, las curvas de unión resultantes se ajustaron globalmente usando los algoritmos informáticos suministrados por el fabricante, BIAcore, Inc. (Piscataway, Nj). Estos algoritmos calculan tanto la K_{on} como la K_{off} , a partir de las que se deduce la constante de unión en equilibrio aparente, K_D , como la relación entre las dos constantes de velocidad (es decir, K_{off}/K_{on}). Un tratamiento más detallado de cómo se derivan las constantes de velocidad individuales puede encontrarse en el BIAevaluation Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Las fases de asociación y de disociación se ajustaron por separado. Se obtuvo la constante de velocidad de disociación para un intervalo de 32-34 s de la fase de disociación de 180 s; el ajuste de la fase de asociación se obtuvo mediante un modelo Langmuir 1:1, y el ajuste de la base se seleccionó sobre la base de criterios de R_{max} y χ^2 para los diacuerpos biespecíficos y el scFv; se usó el ajuste del analito bivalente para la unión del CMD.

Resultados

El análisis de SDS-PAGE en unas condiciones no reductoras reveló que el producto purificado de los sistemas de expresión CMD h3G8, CMD h2B6 y CBD h2B6-h3G8 era, cada uno, una especie individual con un peso molecular estimado de aproximadamente 50 kDa (figura 3, carriles 4, 5 y 6, respectivamente). En unas condiciones reductoras, el producto purificado a partir de cualquiera de los sistemas de expresión del CMD corrió como una banda individual (carriles 1 y 2), mientras que se reveló que el producto purificado del sistema del CBD h2B6-h3G8 eran 2 proteínas individuales (figura 3, carril 3). Todos los polipéptidos purificados del sistema de expresión y visualizados mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras migraron a aproximadamente 28 kDa.

El análisis de SEC de cada uno de los productos del sistema de expresión también reveló una única especie molecular (figura 4B), cada una de las cuales eluía aproximadamente al mismo tiempo que un fragmento Fab de IgG (~ 50 kDa) (figura 4A). Los resultados indican que el producto purificado por afinidad era un homodímero covalente homogéneo para el caso del sistema de expresión del CMD, y un heterodímero covalente homogéneo para el caso del CBD h2B6-h3G8.

Se usó un ensayo de ELISA emparejado para ensayar la especificidad de unión del CBD h2B6-h3G8 por cualquiera o ambos de CD32B y/o de CD16A (figura 5). CD32B sirvió como antígeno diana, y se usó CD16A como sonda secundaria. La señal positiva del ELISA reveló que el CBD heterodimérico h2B6-h3G8 tenía especificidad por ambos antígenos. Un ensayo similar con el CMD h3G8 (que no debería unirse al CD32B) no mostró ninguna señal.

El análisis de SPR indicó que el CMD h3G8 reconocía inmunoespecíficamente sCD16, pero no sCD32B, que el CMD h2B6 reconocía inmunoespecíficamente sCD32B, pero no sCD16, y que el CBD h2B6-h3G8 reconocía inmunoespecíficamente tanto sCD16 como sCD32B (figuras 6A-B). Ninguno de los diacuerpos ensayados se unió al receptor de control, sCD32A (figura 6C).

5 El análisis de SPR también se usó para estimar las constantes cinéticas y en equilibrio de los CMD y del CBD h2B6-h3G8 frente a sCD16 y/o sCD32B. Los resultados se compararon con las mismas constantes calculadas para un scFv de h3G8. Las figuras 7A-E muestran los resultados gráficos del análisis de SPR. Las constantes cinéticas *on* y *off*, así como la constante en equilibrio, calculadas a partir de los resultados representados en la figura 7, se proporcionan en la tabla 13.

10 Tabla 13. Constantes cinéticas y en equilibrio calculadas a partir de datos de BIAcore.

Receptor/analito	k-on	k-off	Kd
sCD16 / diacuerpo h3G8	$2,3 \times 10^5$	0,004	18,0
sCD16 / CBD h2B6-h3G8	$4,6 \times 10^5$	0,010	22,7
sCD16 / scFv h3G8	$3,2 \times 10^5$	0,013	38,7
sCD32B / CBD h2B6-h3G8	$3,6 \times 10^5$	0,005	15,0
sCD32B / diacuerpo h2B6	$6,2 \times 10^5$	0,013	21,0

Acoplados con los resultados del análisis de ELISA, los estudios confirman que el heterodímero covalente h2B6-h3G8 retenía la especificidad tanto por CD32B como por CD16 y podía unirse a ambos antígenos simultáneamente. La molécula está representada químicamente en la figura 8.

15 6.2 Diseño y caracterización de diacuerpos biespecíficos covalentes que comprenden dominios Fc

En un esfuerzo por crear una molécula de tipo IgG, es decir, que comprende un dominio Fc, uno de los polipéptidos que comprende la molécula heterodimérica CBD presentada en el ejemplo 6.1 se modificó para que comprendiera adicionalmente un dominio Fc (creando una cadena "más pesada" y una "más ligera", análogas a la cadena pesada y ligera de un anticuerpo). La molécula biespecífica heterodimérica contendría entonces un dominio Fc que dimerizaría con una molécula homóloga, formando una molécula de tipo IgG tetramérica con tetravalencia (es decir, formada por una dimerización a través de los dominios Fc de las moléculas biespecíficas heterodiméricas). De forma interesante, dichas moléculas tetraméricas no fueron detectadas en el medio acondicionado de los sistemas de expresión recombinantes que usan los ensayos funcionales, por ejemplo, el ensayo del medio acondicionado para evaluar la unión inmunospecífica a los antígenos diana. En su lugar, solo se detectó una molécula dimerica, que comprende monómeros que consisten en un dominio VL, VH y Fc, en dichos ensayos funcionales. Para ensayar si se cuestionaba la estabilidad de la teórica estructura tetramérica, se diseñaron polipéptidos que comprenden el dominio Fc para que comprendieran adicionalmente una región de bisagra, mientras que los polipéptidos que comprenden la cadena "más ligera" se modificaron para que comprendieran adicionalmente los 6 aminoácidos del extremo C del dominio constante de la cadena ligera kappa humana. Cuando dichas cadenas rediseñadas "más pesadas" y "más ligeras" se coexpresaban en los sistemas de expresión recombinantes, los ensayos funcionales detectaban las moléculas de diacuerpo que podían unirse inmunoespecíficamente tanto a los antígenos diana como a los anticuerpos anti-Fc.

Materiales y métodos

35 Construcción y diseño de moléculas polipeptídicas: se diseñaron vectores de expresión de ácidos nucleicos para producir versiones modificadas de las construcciones 1 y 2 presentadas en el ejemplo 6.1. La construcción 5 (SEQ ID NO: 14) y la 6 (SEQ ID NO: 15) se crearon mediante genomanipulación de la construcción 1 y 2, respectivamente, para que comprendieran adicionalmente un dominio Fc. La construcción 7 (SEQ ID NO: 16) se creó mediante genomanipulación de la construcción 1 para que comprendiera adicionalmente la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23) en su extremo C. La construcción 8 (SEQ ID NO: 18) se creó mediante genomanipulación de la construcción 2 para que comprendiera adicionalmente una región de bisagra y un dominio Fc (que comprende la mutación V215A). Se muestra una representación esquemática de las construcciones 5-8 en la figura 9.

45 PCR y construcción del vector de expresión: todos los protocolos de PCR y de purificación del producto de PCR fueron como se describe en el ejemplo 6.1 Los plásmidos pMGX0669 y pMGX0667 sirvieron como moldes para las secuencias codificantes de las construcciones 1 y 2, respectivamente. Las secuencias codificantes para el dominio Fc de HulgG y/o el dominio de bisagra fueron la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 5, respectivamente. Las secuencias codificantes de los ADN de molde se amplificaron usando unos cebadores directo

e inverso tales que los productos de PCR contendrían secuencias solapantes, permitiendo que la PCR solapante generara las secuencias codificantes de los productos deseados.

La secuencia codificante de la construcción 1 se amplificó a partir de pMGX0669 usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 62, respectivamente. La secuencia codificante de la construcción 2 se amplificó a partir de pMGX0667 usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 63, respectivamente. La bisagra-Fc de HulgG se amplificó usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66, respectivamente. La construcción 7 (SEQ ID NO: 16) se amplificó a partir de pMGX0669 usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 67.

PCR solapante: los productos iniciales de PCR se combinaron como se describe a continuación, se amplificaron y se purificaron como se describe en el ejemplo 6.1.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 5, SEQ ID NO: 14 (mostrada esquemáticamente en la figura 9), se amplificó mediante la combinación de los productos de PCR de las amplificaciones de la construcción 1 y el Fc de HulgG y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 64, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 6, SEQ ID NO: 15 (mostrada esquemáticamente en la figura 9), se amplificó mediante la combinación de los productos de PCR de las amplificaciones de la construcción 2 y el Fc de HulgG y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 66, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 8, SEQ ID NO: 18 (mostrada esquemáticamente en la figura 9), se amplificó mediante la combinación de los productos de PCR de las amplificaciones de la construcción 2 y la bisagra-Fc de HulgG y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 66, respectivamente.

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) como se describe previamente. Las construcciones que codifican el plásmido se denominaron como se identifica en la tabla 14:

Tabla 14. Construcciones plasmídicas

Construcción codificante	Denominación del plásmido	Inserto
5	pMGX0676	hu2B6VL-hu3G8VH-huFc
6	pMGX0674	hu3G8VL-hu2B6VH-huFc
7	pMGX0677	Hu2B6VL-hu3G8VH-FNRGEC
8	pMGX0678	Hu3G8VL-hu2B6VH-hu bisagra-Fc (A215V)

Expresión del polipéptido/diacuerpo: se llevaron a cabo cuatro cotransfecciones por separado en células HEK-293 usando Lipofectamine 2000, como se describe en la sección 6.1: pMGX0669 y pMGX0674, que codifican las construcciones 1 y 6, respectivamente; pMGX0667 y pMGX0676, que codifican las construcciones 2 y 5, respectivamente; y pMGX0677 y pMGX0678, que codifican las construcciones 7 y 8, respectivamente.

La cotransfección de estos plásmidos se diseñó para que diera lugar a la expresión de un diacuerpo biespecífico (CBD) de tetravalencia con una estructura de tipo IgG, inmuno-específico tanto para el FcγRIIB como para el FcγRIIA. También se llevó a cabo una cotransfección adicional: pMGX0674 y pMGX0676, que codifican las construcciones 6 y 5, respectivamente. Después de tres días en cultivo, se recogió el medio acondicionado. La cantidad de producto secretado en el medio acondicionado se cuantificó mediante un ELISA anti-Fc de la IgG usando Fc purificado como patrón. Las concentraciones de producto en las muestras se normalizaron después sobre la base de la cuantificación, y se usaron las muestras normalizadas para el resto de los ensayos.

ELISA: se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo secretadas en el medio mediante un ELISA emparejado, como se describe, *supra*. Salvo que se indique, se usó CD32B para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se usó CD16 conjugada con HRP como sonda.

Resultados

Se usó un ensayo de ELISA para ensayar las muestras normalizadas de los sistemas de expresión recombinante que comprenden las construcciones 1 y 6 (pMGX669-pMGX674), las construcciones 2 y 5 (pMGX667-pMGX676) y las construcciones 5 y 6 (pMGX674-pMGX676) para evaluar la expresión de las moléculas de diacuerpo que pueden unirse simultáneamente a CD32B y a CD16A (figura 10). Los datos del ELISA indicaron que la cotransfección con las construcciones 1 y 6 o la cotransfección con las construcciones 2 y 5 no consiguieron producir un producto que pudiera unirse a alguno o a los dos antígenos (figura 10, □ y ▲, respectivamente). Sin embargo, la cotransfección de las construcciones 5 y 6 dio lugar a la secreción de un producto que puede unirse a ambos antígenos CD32B y CD16. El último producto era un dímero de las construcciones 5 y 6, que contiene un sitio de unión para cada antígeno con la estructura representada esquemáticamente en la figura 11.

Para dirigir la formación de una estructura heterotetramérica de tipo IgG, se unió la secuencia codificante de seis aminoácidos adicionales al extremo C de la construcción 1, generando la construcción 7 (SEQ ID NO: 16 y mostrada esquemáticamente en la figura 9). Los seis aminoácidos adicionales, FNRGEC (SEQ ID NO: 23), derivaban del extremo C de la cadena ligera kappa, y normalmente interactúan con el dominio de bisagra superior de la cadena pesada en una molécula de IgG. Después se modificó un dominio de bisagra en la construcción 6, generando la construcción 8 (SEQ ID NO: 18 y figura 9). La construcción 8 comprendía adicionalmente una mutación de aminoácido en la región de bisagra superior, A215V. Después se cotransfectaron plásmidos de expresión que codifican la construcción 7 y la construcción 8, pMGX677 y pMGX678, respectivamente, en células HEK-293, y se expresaron como se describe.

Las moléculas de diacuerpo producidas a partir del sistema de expresión recombinante que comprende las construcciones 7 y 8 (pMGX0677 + pMGX0678), se compararon en un ensayo de ELISA para evaluar la unión de CD32B y de CD16a a las moléculas de diacuerpo producidas a partir de los sistemas de expresión que comprenden las construcciones 1 y 6 (pMGX669 + pMGX674), las construcciones 2 y 8 (pMGX669 + pMGX678) y las construcciones 6 y 7 (pMGX677 + pMGX674) (figura 12).

Como antes, la molécula producida por el sistema de expresión que comprende las construcciones 1 y 6 (pMGX669 + pMGX674) resultó incapaz de unirse a CD32A ni a CD16A (figura 10 y figura 12). Por el contrario, el producto de la coexpresión de cualquiera de las construcciones 7 y 6 (pMGX0677 + pMGX0674) o de la coexpresión de las construcciones 7 y 8 (pMGX0677-pMGX0678) podía unirse tanto a CD32B como a CD16 (figura 12). Se aprecia que la construcción 7 es análoga a la construcción 1, con la excepción de que la construcción 7 comprende la secuencia del extremo C FNRGEC (la SEC ID NO: 23); y que la construcción 8 es análoga a la construcción 6, excepto porque la construcción 8 comprende un dominio de bisagra y la mutación A215V. Los datos indican que la adición de 6 aminoácidos adicionales en el extremo C de la cadena ligera C-kappa (FNRGEC; la SEQ ID NO: 23) a la cadena no portadora del Fc, "más ligera", ayudó a estabilizar la formación de las moléculas de diacuerpo tetraméricas de tipo IgG, independientemente de si la correspondiente cadena más pesada comprendía un dominio de bisagra (es decir, pMGX0677 + pMGX0674 y pMGX0677-pMGX0678, figura 12). La adición del dominio de bisagra al polipéptido portador del Fc "más pesado", sin la adición de la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23) en el extremo C a la correspondiente cadena "más ligera", era aparentemente incapaz de lograr una estabilización similar (es decir, carece de la unión por parte del producto de cotransfección de las construcciones 2 y 8 (pMGX669 + pMGX678)). La estructura de la molécula de diacuerpo tetramérica está representada esquemáticamente en la figura 13.

6.3 Efecto del orden de dominios y de los puentes de disulfuro adicionales sobre la formación del diacuerpo tetramérico de tipo IgG

Se investigó el efecto de la estabilización adicional entre las cadenas polipeptídicas "más ligeras" y "más pesadas" de la molécula de diacuerpo tetramérica de tipo IgG mediante la sustitución de restos seleccionados de las cadenas polipeptídicas por cisteínas. Los restos adicionales de cisteína proporcionan puentes disulfuro adicionales entre las cadenas "más pesadas" y las "más ligeras". Adicionalmente, se investigó el orden de los dominios sobre la actividad de unión mediante el desplazamiento del dominio Fc o del dominio de bisagra-Fc desde el extremo C de la cadena polipeptídica al extremo N. Aunque la actividad de unión de la molécula que comprende los puentes disulfuro adicionales no estaba alterada con respecto a las moléculas de diacuerpo construidas previamente con dichos enlaces, la transferencia del dominio Fc o de bisagra-Fc al extremo N de la cadena polipeptídica "más pesada" que comprende el diacuerpo sorprendentemente mejoró la afinidad de unión y/o la avidéz de la molécula biespecífica por uno o ambos de sus antígenos diana.

Materiales y métodos

Construcción y diseño de moléculas polipeptídicas: se diseñaron vectores de expresión de ácidos nucleicos para producir versiones modificadas de las construcciones 5, 6 y 8 presentadas en el ejemplo 6.2. La construcción 9 (SEQ ID NO: 19) y la construcción 10 (SEQ ID NO: 20) (mostradas ambas esquemáticamente en la figura 13) eran análogas a las construcciones 8 y 6, con la excepción de que el dominio Fc o el dominio de bisagra-Fc, respectivamente, se habían desplazado desde el extremo C del polipéptido hasta el extremo N. Adicionalmente, todos los dominios Fc usados eran dominios Fc de la IgG1 de tipo silvestre. La construcción 11, SEQ ID NO: 21 (mostrada esquemáticamente en la figura 14) era análoga a la construcción 2 del ejemplo 6.1 excepto porque el extremo C se diseñó para que comprendiera adicionalmente la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23). La construcción 12, SEQ ID NO: 22 (mostrada esquemáticamente en la figura 14), era análoga a la construcción 5 del ejemplo 6.2 excepto porque el dominio Fc comprendía adicionalmente una región de bisagra. También, para las construcciones 11 y 12, el dominio VL de 2B6 y el dominio VH de 2B6 comprendían una única modificación de aminoácido (G105C y G44C, respectivamente) de forma que una glicina de cada dominio estaba sustituida por una cisteína.

PCR y construcción del vector de expresión: todos los protocolos de PCR y los productos de purificación de PCR fueron como se describe en el ejemplo 6.1 y 6.2.

PCR solapante: los productos finales se construyeron, se amplificaron y se purificaron usando los métodos descritos en el ejemplo 6.1 y en el ejemplo 6.2.

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) como se describe previamente. Los plásmidos que codifican las construcciones se denominaron como se identifica en la tabla 15:

5 Tabla 15. Construcciones plasmídicas

Construcción codificante	Denominación del plásmido	Inserto
9	pMGX0719	Hubisagra/Fc-hu3G8VL-hu2B6VH
10	pMGX0718	HuFc-hu2B6VL-hu3G8VH
11	pMGX0716	Hu2B6VL(G/C)-hu3G8VH-hubisagraFc
12	pMGX0717	Hu3G8VL-hu2B6VH (G/C)-FNRGEC

10 **Expresión del polipéptido/diacuerpo:** se llevaron a cabo tres cotransfecciones por separado en células HEK-293 usando Lipofectamine 2000, como se describe en la sección 6.1: pMGX0669 y pMGX0719, que codifican las construcciones 1 y 9, respectivamente; pMGX0669 y pMGX0718, que codifican las construcciones 1 y 10, respectivamente; y pMGX0617 y pMGX0717, que codifican las construcciones 11 y 12, respectivamente. La cotransfección de estos plásmidos se diseñó para que diera lugar a la expresión de un diacuerpo biespecífico (CBD) de tetravalencia con una estructura de tipo IgG, inmuno-específico tanto para el Fc γ RIIB como para el Fc γ RIIA. Después de tres días en cultivo, se recogió el medio acondicionado. La cantidad de producto secretado en el medio
15 concentraciones de producto en las muestras se normalizaron después sobre la base de la cuantificación, y se usaron las muestras normalizadas para el resto de los ensayos.

ELISA: se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo secretadas en el medio mediante un ELISA emparejado, como se describe *supra*. Salvo que se indique, se usó CD32B para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se usó CD16 conjugada con HRP como sonda.

20 **Transferencia de Western:** se analizaron aproximadamente 15 ml de medio acondicionado procedente de las tres cotransfecciones descritas anteriormente mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Se tiñó un gel con Simply Blue Safestain (Invitrogen) y se transfirió un gel idéntico a una membrana de PVDF (Invitrogen) usando métodos de transferencia convencionales. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5 % en PBS 1x. Después, la membrana se incubó en 10 ml de anticuerpo de cabra anti-IgG1
25 H+L humana conjugado con HRP diluido 1:8000 en leche desnatada en polvo al 2 % en PBS 1x/Tween 20 al 0,1 % a la temperatura ambiente durante 1 h con agitación suave. Después de un lavado con PBS 1x/Tween 20 al 0,3 %, 2 x 5 min de cada uno, después 20 min a temperatura ambiente, la membrana se reveló con un sistema de detección de transferencia de Western ECL (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La película se reveló en un procesador de rayos X.

30 Resultados

El medio acondicionado de los sistemas de expresión recombinantes que comprenden las construcciones 1 y 9; las construcciones 1 y 10; y las construcciones 11 y 12, se analizó mediante un análisis de SDS-PAGE (en condiciones no reductoras) y transferencia de Western (usando un anti-IgG como sonda). La transferencia de Western reveló que el producto de los sistemas que comprenden las construcciones 11 y 12 o los que comprenden las construcciones 9
35 y 1 formaba predominantemente una única especie de molécula de aproximadamente 150 kDa (figura 15, carriles 3 y 2, respectivamente). Estos dos productos tienen puentes disulfuro internos modificados entre las cadenas "más ligeras" y las "más pesadas" que comprenden el diacuerpo. Por el contrario, la molécula sin los puentes disulfuro internos modificados entre las cadenas "más ligeras" y las "más pesadas", formada por las construcciones 10 y 1, formaba al menos dos especies moleculares con unos pesos moleculares de ~ 75 y de ~ 100 kDa (figura 15, carril
40 1).

A pesar de los resultados de la transferencia de Western, se averiguó que cada uno de los tres productos podía unirse tanto a CD32A como a CD16 (figura 16). Sorprendentemente, con respecto al producto que comprende un dominio de bisagra-Fc del extremo C (formado por las construcciones 11 y 12), el producto de ambos sistemas en los que el dominio Fc (o Fc-bisagra) estaba en el extremo amino de la cadena polipeptídica que contiene Fc (es
45 decir, la cadena "más pesada") (construcciones 9 + 1 y construcciones 10 + 1) mostró una afinidad y/o avidez potenciadas por uno o ambos de sus péptidos diana (es decir, CD32B y/o CD16).

6.4 Efecto del sitio de escisión interno/externo sobre el procesamiento del precursor de la poliproteína y la expresión del diacuerpo biespecífico covalente; diseño y caracterización de diacuerpo biespecífico que comprende partes de la cadena lambda y el dominio de bisagra de la IgG humana

Como se describe en la presente memoria, las cadenas polipeptídicas individuales del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo de la invención puede expresarse en forma de una molécula precursora de poliproteína individual. Se ensayó la capacidad de los sistemas recombinantes descritos en los ejemplos 6.1-6.3 de procesar y expresar apropiadamente un CBD funcional a partir de dicho precursor de poliproteína mediante la genomanipulación de un ácido nucleico para que codificara tanto la primera como la segunda cadena polipeptídica de un CBD separadas por un sitio de escisión interno, en particular, un sitio de escisión de furina. El CBD funcional se aisló del sistema recombinante que comprende la molécula precursora de poliproteína.

Como se analiza en el ejemplo 6.3, se averiguó que la adición de los 6 aminoácidos del extremo C de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO: 23) estabiliza la formación del diacuerpo, posiblemente a través de una interacción intercatenaria potenciada entre los dominios que comprenden la SEQ ID NO: 23 y aquellos dominios que comprenden un dominio Fc o un dominio de bisagra-Fc. El efecto estabilizador de esta interacción de tipo cadena lambda/Fc se ensayó en el CBD en el que ninguna cadena polipeptídica comprendía un dominio Fc. Se modificó una cadena polipeptídica del diacuerpo para que comprendiera la SEQ ID NO: 23 en su extremo C; la cadena polipeptídica compañera se modificó para que comprendiera la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77), que derivaba del dominio de bisagra de una IgG. La comparación de este CBD con el formado por las construcciones 1 y 2 (del ejemplo 6.1) reveló que el CBD que comprende los dominios derivados del dominio de bisagra y la cadena lambda mostraba una afinidad ligeramente mayor por uno o ambos de sus epítopos diana.

Materiales y métodos

Construcción y diseño de moléculas polipeptídicas: precursor de poliproteína: se diseñaron vectores de expresión de ácidos nucleicos para producir 2 moléculas precursoras de poliproteína, representadas ambas esquemáticamente en la figura 17. La construcción 13 (SEQ ID NO: 95) comprendía desde el extremo N de la cadena polipeptídica, el dominio VL de 3G8, el dominio VH de 2.4G2 (que se une a mCD32B), un sitio de escisión de furina, el dominio VL de 2.4G2 y el dominio VH de 3G8. La secuencia de nucleótidos que codifica la construcción 13 se proporciona en la SEQ ID NO: 96. La construcción 14 (SEQ ID NO: 97) (figura 17), comprendía desde el extremo N de la cadena polipeptídica, el dominio VL de 3G8, el dominio VH de 2.4G2 (que se une a mCD32B), un sitio de escisión de furina, un sitio de FMD (la proteasa C3 del virus de la glosopeda), el dominio VL de 2.4G2 y el dominio VH de 3G8. La secuencia de nucleótidos que codifica la construcción 14 se proporciona en la SEQ ID NO: 98.

Se diseñaron vectores de expresión de ácidos nucleicos para producir las versiones modificadas de las construcciones 1 y 2 presentadas en el ejemplo 6.1. La construcción 15 (SEQ ID NO: 99) (figura 17) era análoga a la construcción 1 (SEQ ID NO: 9), presentada en ejemplo 6.1, con la excepción de que el extremo C de la construcción 15 comprendía la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO: 23). La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 15 se proporciona en la SEQ ID NO: 100. La construcción 16 (SEQ ID NO: 101) (figura 17) era análoga a la construcción 2, presentada en el ejemplo 6.1, con la excepción de que el extremo C de la construcción 16 comprendía la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 77). La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 16 se proporciona en la SEQ ID NO: 102.

PCR y construcción del vector de expresión: todos los protocolos de PCR y los productos de purificación de PCR fueron como se describe en el ejemplo 6.1 y 6.2

PCR solapante: los productos finales se construyeron, se amplificaron y se purificaron usando los métodos descritos en el ejemplo 6.1 y en el ejemplo 6.2 con los cebadores apropiados.

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) como se describe previamente. Los plásmidos que codifican las construcciones se denominan como se identifica en la tabla 16:

Tabla 16. Construcciones plasmídicas

Construcción codificante	Denominación del plásmido	Inserto
13	pMGX0750	3G8VL-2.4G2VH-Furina-2.4G2VL-3G8VH
15	pMGX0752	Hu2B6VL-Hu3G8VH-FNRGEC
16	pMGX0753	Hu3G8VL-Hu2B6VH-VEPKSC

Expresión del polipéptido/diacuerpo: se realizó una transfección y una cotransfección en células HEK-293 usando Lipofectamine 2000, como se describe en la sección 6.1: individual: pMGX0750, que codifica la construcción 13; y

cotransfección: pMGX0752 y pMGX0753, que codifican las construcciones 15 y 16, respectivamente. Después de tres días en cultivo, se recogió el medio acondicionado y el producto secretado se purificó por afinidad como se describe.

- 5 ELISA: se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo secretadas en el medio mediante un ELISA emparedado, como se describe, *supra*. Se usó CD32B murina para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se usó CD16A conjugada con HRP como sonda para el producto de cotransfección de las construcciones 15 y 16. Se usó mCD32B como proteína diana, y se usó CD16A conjugada con biotina como sonda para el sistema recombinante que comprende la construcción 13.

Resultados

- 10 El medio acondicionado de los sistemas de expresión recombinantes que comprenden las construcciones 13 se analizó mediante ELISA emparedado. El ensayo de ELISA ensayó la especificidad de la unión del CBD por una o ambas de mCD32B y/o CD16 (figura 18). CD32B sirvió como antígeno diana, y se usó CD16A como sonda secundaria. La señal positiva del ELISA reveló que el CBD h2.4G2-h3G8 heterodimérico producido a partir del precursor de poliproteína tenía especificidad por ambos antígenos.
- 15 Asimismo, el producto purificado generado mediante cotransfección de los vectores que codifican las construcciones 15 y 16 se ensayó en un ensayo de ELISA y se comparó con el producto comprendido por las construcciones 1 y 2 (ejemplo 6.1). CD32B sirvió como antígeno diana, y se usó CD16A como sonda secundaria. Al igual que con el producto comprendido por las construcciones 1 y 2, se averiguó que el producto de las construcciones 15 y 16 podía unirse simultáneamente a CD32B y a CD16A. De hecho, el producto de las construcciones 15 y 16 mostró una
- 20 afinidad ligeramente potenciada por uno o ambos antígenos diana, es decir, CD32B o CD16A. Esto es debido quizás al aumento en la estabilidad y o en la fidelidad (con respecto a una interacción del dominio VH-VL de tipo silvestre) de la asociación intercatenaria proporcionada por la interacción de la región de la cadena lambda, FNRGEC (SEQ ID NO: 23) y la región de bisagra VEPKSC (SEQ ID NO: 77), que está ausente en el producto comprendido por las construcciones 1 y 2.

25 6.5 Uso de reactivos de redirección de afinidad doble ("DART") para ligar múltiples afinidades juntas

- Un aspecto de la presente divulgación se refiere a nuevos reactivos de redirección de afinidad doble ("DART"), así como nuevas maneras de ligar múltiples afinidades juntas. Los "DART" pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos, etc., por tanto, pueden unirse simultáneamente a uno, dos, tres o más epítopos diferentes (que pueden ser del mismo antígeno o de diferentes). Los "DART" adicionalmente pueden ser monovalentes, bivalentes,
- 30 trivalentes, tetraivalentes, pentavalentes, hexavalentes, etc., por tanto, pueden unirse simultáneamente a una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más moléculas. Como se muestra en la figura 35, estos dos atributos de DART pueden combinarse, por ejemplo, para producir anticuerpos biespecíficos que sean tetraivalentes, etc.

- Un avance es el desarrollo de un DART que tenga afinidad por un receptor inmunitario prototípico, huCD32B, así como afinidad por un hapteno, fluoresceína. Este DART, denominado "2B6/4420," sirve como adaptador universal,
- 35 puede coligar huCD32B con moléculas que interactúan con compañeros de unión conjugados a fluoresceína. CD32B es un receptor de Fc que tiene la capacidad de inactivar las señales activadoras debido al agrupamiento con inmunocomplejos de señalización de activación. En su implementación inicial, esta tecnología permite un rápido cribado de varias dianas biológicas para el agrupamiento con huCD32B sin la necesidad de generar nuevas construcciones DART. El 2B6/4420 simplemente puede mezclarse con un anticuerpo marcado con fluoresceína
- 40 contra un receptor de superficie celular y, de este modo, imita la acción de un DART con afinidad por ese receptor (figura 20). Además, este reactivo permite una vinculación eficaz de los reactivos de afinidad que no se expresan o producen fácilmente, permitiendo superar las limitaciones técnicas. Los DART que contienen 2B6/4420 son claramente útiles como herramientas de investigación y también como candidatos clínicos. 2B6/4420 producido a partir de células HEK293 puede unirse simultáneamente a CD32B y fluoresceína en un ensayo de ELISA.
- 45 Adicionalmente, puede inhibir la proliferación celular mediante el reclutamiento de CD32B en el complejo BCR mediante coligamiento con CD79. El brazo 2B6 del DART puede remplazarse con una secuencia de anticuerpo diferente o una secuencia de unión que tenga otra especificidad relevante.

Materiales y métodos:

- Construcciones plasmídicas*: 2B6/4420 se obtiene de secuencias de MAb 2B6 humanizado (hu2B6, MGA321) y una
- 50 versión quimérica de Fv ratón/Fc humano del MAb anti fluoresceína, 4420. El DART completamente ensamblado consiste en dos polipéptidos, que provocan la unión covalente de dos regiones Fv. El primer polipéptido consiste en una secuencia señal de secreción seguida del hu2B6VL producido como una proteína de fusión con 4420VH separado por un conector que consiste en los restos de aminoácido GGGSGGGG. La secuencia FNRGEC, derivada del extremo C de la cadena ligera kappa, se adjunta al extremo C de este polipéptido. El otro polipéptido consiste en
- 55 la secuencia señal-4420VL-GGGSGGGG-hu2B6VH, con la secuencia VEPKSC, derivada del extremo C del fragmento Fd de IgG1 humana, añadido al extremo C. Las cisteínas en las dos cadenas forman un enlace disulfuro, que une covalentemente los dos polipéptidos juntos (figura 20). Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos descritos se amplificaron por PCR a partir de plásmidos existentes, se combinaron por PCR solapante y

se clonaron en pCIneo (Promega) entre los sitios Nhe I y EcoR I. Finalmente, se usó un DART con afinidad por huCD32B y huCD16 (2B6/3G8) que se ha construido previamente usando métodos similares a los descritos anteriormente, como control.

Anticuerpos: Los anticuerpos monoclonales murinos anti-CD79b humana, CB3.1 y CB3.2 (hibridomas) se obtuvieron de Dr. Cooper MD, Universidad de Alabama en Birmingham, Birmingham AL. CB3.1 y CB3.2 se marcaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC) siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford IL). El fragmento F(ab')₂ de una IgG de cabra antirratón (GAM), específico del fragmento Fc se obtuvo de Jackson Laboratories (West Grove, PA). El MAbs de ratón anti-huCD32B, 3H7, se produjo y purificó de en el propio laboratorio. El anticuerpo de cabra anti-2B6Fv se produjo inmunizando cabras con anticuerpo complejo hu2B6 y purificando por afinidad frente a la región Fv de hu2B6. Se obtuvieron HulgG, FITC-hulgG y HRP-IgG antirratón de Jackson Immunoresearch. HRP-anticuerpo anticabra se obtuvo de Southern Biotech.

Expresión de DART: Los plásmidos que codifican cada cadena se contranfectaron en células 293H (Invitrogen) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína secretada se recogió 3-4 veces a intervalos de tres días y se purificaron por cromatografía de líquidos frente a una forma soluble inmovilizada de CD32B.

ELISA: Los DART 2B6/4420 o 2B6/3G8 se capturaron en placas MaxiSorp (Nalge Nunc) recubiertas con proteína S marcada con FITC (Novagen), IgG humana o FITC-hulgG. La detección prosiguió mediante unión del ectodominio CD32B soluble, seguido de 3H7 (un anticuerpo monoclonal de ratón específico para CD32B), y finalmente anticuerpo antirratón-HRP. Como alternativa, la detección se realizó mediante unión de antisuero policlonal de cabra anti-Fv 2B6 purificado por afinidad, seguido de anticuerpo anticabra-HRP. La actividad de HRP se detectó usando un sustrato TMB colorimétrico (BioFX) y se leyó en un lector de placas de ELISA VersaMax.

Purificación de linfocitos B y ensayo de proliferación: Se separaron leucocitos mononucleares de sangre periférica por un método de gradiente en Ficoll/Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, R.U.) usando sangre de donadores sanos. Los linfocitos B se aislaron usando kit de aislamiento negativo de linfocitos B Dynal (Dynal Biotechnology Inc., NY) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de los linfocitos B aislados (CD20⁺) fue mayor de un 90 % estimada por análisis FACS. Para el ensayo de proliferación, los linfocitos B purificados se sembraron en medio RPMI 1640 completo en placas de microvaloración de 96 pocillos de fondo redondo a una densidad celular de 1×10^5 células por pocillo en un volumen final de 200 μ l y se incubaron durante 48 h en presencia o ausencia de anticuerpos y diacuerpos a 37 °C en un 5 % de CO₂. Después se añadió 1 μ Ci/pocillo de [³H]timidina (Perkin Elmer, Wellesley, MA) y la incubación continuó durante 16-18 h adicionales antes de la recogida. La incorporación de [³H]timidina se midió por recuento de centello líquido.

Resultados

Para demostrar que el DART 2B6/4420 era activo y específico, se realizaron dos experimentos de ELISA. En primer lugar, 2B6/4420 o 2B6/3G8 (como control negativo) se unió a una proteína conjugada a fluoresceína (proteína S) que se había recubierto sobre placas de ELISA. A continuación, el brazo 2B6 del DART se captó por CD32B soluble. La unión se detectó mediante otro anticuerpo contra CD32B con un epítipo que no solapa con el de 2B6, seguido de anticuerpo secundario conjugado con HRP. Aunque 2B6/4420 puede unirse simultáneamente a fluoresceína y CD32B, 2B6/3G8 no (figura 21, panel A). Cuando los DART se capturan en placas recubiertas con CD32B soluble y se detecta la unión mediante un anticuerpo específico para hu2B6 Fv, ambos DART muestran buena unión. Para demostrar que el DART 2B6/4420 podía unirse a fluoresceína conjugada con IgG humana (dado que este es el contexto de la implementación inicial de este reactivo), HulgG, sin marcar o marcado con fluoresceína, se unió a placas de ELISA y se usó para capturar 2B6/4420. De nuevo, se usó 2B6/3G8 como control negativo. La unión se detectó usando un anticuerpo específico para Fv Hu2B6. El DART 2B6/4420 se une claramente a FITC-HulgG, pero no se une a HulgG sin marcar, lo que demuestra que este DART puede unirse a fluoresceína conjugada a un anticuerpo y que no hay unión significativa al anticuerpo en solitario. Como se esperaba, no se detectó unión por el DART 2B6/3G8 en ninguno de estos contextos.

Se realizaron experimentos para demostrar que el DART 2B6/4420 podía funcionar como reactivo de afinidad doble que podía tener un efecto en la señalización en el contexto de un ensayo basado en células. La coagregación de CD32B con la BCR ha demostrado inhibir la activación de linfocitos B. Se exploró la capacidad del DART 2B6/4420 de cocaptar CD32B con la BCR recubierta con anticuerpos contra α CD79b marcados con fluoresceína y activar la inhibición de la proliferación celular. Los linfocitos B se seleccionaron negativamente de sangre humana y se activaron mediante tratamiento con concentraciones crecientes de anticuerpo de ratón anti-CD79b humano marcado con FITC, clones CB3.1 y CB3.2, y mediante la adición de un fragmento F(ab')₂ de un GAM específico de Fc como reactivo secundario para reticular la BCR, junto con una concentración fija (5 μ g/ml) de DART 2B6/4420 o una cantidad equivalente de DART 2B6/3G8, una molécula que no está dirigida a fluoresceína, por tanto usada como control. La proliferación celular, medida como la incorporación de [³H]-timidina, aumentó con concentraciones crecientes del activador monoclonal anti-CD79b-FITC en ausencia de DART o en presencia del DART 2B6/3G8 de control. La presencia de DART 2B6/4420 dio lugar a una profunda reducción en la proliferación de linfocitos B a todas las concentraciones de anticuerpo anti-CD79b humano-FITC (figura 22, paneles A y B y figura 23, panel A).

No se observó inhibición de la proliferación cuando los linfocitos B recubiertos con CB3.2 sin marcar y activados usando las mismas condiciones experimentales se trataban con DART 2B6/4420, que proporciona su especificidad de diana (figura 23, panel B). Estos datos demuestran que DART 2B6/4420 puede reticular CD32B y el BCR y suministrar una señal inhibidora que puede bloquear la activación celular inducida por el receptor de antígeno.

5 6.6 DART inmunoterapéutico contra neoplasias de linfocitos B que expresan CD32B

Actualmente, las neoplasias de linfocitos B se tratan usando anticuerpo anti-CD20 Rituxan®. Algunas neoplasias de linfocitos B, sin embargo, no expresan CD20 o llegan a ser resistentes a Rituxan. Los DART de la presente divulgación proporcionan un agente inmunoterapéutico alternativo que puede superar los problemas asociados con el anticuerpo anti-CD20 Rituxan®.

10 MGD261 es una molécula de redirección de afinidad doble (DART) que se une a hCD32B (mediante el anticuerpo h2B6) y hCD16A y hCD16B (mediante el anticuerpo h3G8).

La eficacia (reducción de linfocitos B) y toxicidad de MGD261 se ensayaron en mCD32^{-/-} hCD16A⁺ C57B1/6, mCD32^{-/-} hCD32B⁺ C57B1/6 y mCD32^{-/-} hCD16A⁺ hCD32B⁺ C57B1/6. Este experimento de dosis repetida, los ratones recibieron 6 inyecciones IV (dos veces a la semana durante 3 semanas). La reducción de linfocitos B se controló por FACS. La toxicidad se controló por observación dentro de la jaula.

15 Los datos indican que MGD261 puede reducir los linfocitos B en ratones doble transgénicos sin inducir ningún efecto secundario significativo.

Los datos indican que MGD261 puede reducir los linfocitos B en ratones doble transgénicos sin inducir ningún efecto secundario significativo.

20 Datos: a ratones mCD32^{-/-} hCD16A⁺ C57B1/6, mCD32^{-/-} hCD32B⁺ C57B1/6 y mCD32^{-/-} hCD16A⁺ hCD32B⁺ C57B1/6 de la colonia de cría MacroGenics se les inyectó IV en los días 0, 3, 7, 10, 14 y 17 MGD261 (10, 3, 1 o 0,3 mg/kg), o un anticuerpo irrelevante (hE16 10 mg/kg). Se recogió sangre en los días -19 (antes de la exanguinación) 4, 11, 18, 25 y 32 para análisis FACS. La salud del animal y la actividad se registraron tres veces a la semana.

Diseño:

Grupo	Animales		Artículo de ensayo	Dosis (mg/kg)
	n.º	Ratones		
A	4	<u>mCD32^{-/-} hCD16A⁺</u>	hE16	10
B	5	<u>mCD32^{-/-} hCD16A⁺</u>	MGD261	10
C	3	<u>mCD32^{-/-} hCD32B⁺</u>	hE16	10
D	3	<u>mCD32^{-/-} hCD32B⁺</u>	MGD261	10
E	5	<u>mCD32^{-/-} hCD16A⁺ hCD32B⁺</u>	hE16	10
F	5	<u>mCD32^{-/-} hCD16A⁺ hCD32B⁺</u>	MGD261	10
G	5	<u>mCD32^{-/-} hCD16A⁺ hCD32B⁺</u>	MGD261	3
H	5	<u>mCD32^{-/-} hCD16A⁺ hCD32B⁺</u>	MGD261	1
I	5	<u>mCD32^{-/-} hCD16A⁺ hCD32B⁺</u>	MGD261	0,3

25 *Método de análisis FACS:* Se recogieron muestras de sangre completa a los 18 días antes de la administración de h2B6-h3G8 y 4, 11, 18, 25 y 32 días después del tratamiento. Las muestras de sangre se analizaron para determinar el efecto de h2B6-h3G8 sobre los recuentos de linfocitos B mediante un ensayo basado en FACS. Se usó un protocolo sin lavado para el recuento de linfocitos B, linfocitos T y PMN usando microesferas FlowCount, obtenidas de Beckman Coulter. El panel de anticuerpos usados en el análisis fue 1A8-FITC para PMN, CD3-PE para linfocitos T, CD19-APC para linfocitos B y CD45-PerCP para leucocitos totales.

30 T, CD19-APC para linfocitos B y CD45-PerCP para leucocitos totales.

Resultados

Los ratones tratados con hE16 o MGD261 (a cualquier concentración) no mostraban ningún signo de malestar en ningún momento durante el transcurso de la experimentación.

35 Se observó reducción de linfocitos B en ratones doble transgénicos para hCD16A y hCD32B. El anticuerpo h2B6-3G8 capta células efectoras que expresan hCD16A y linfocitos B que expresan hCD32B; las captaciones eran

necesarias para la eliminación de linfocitos B. No se observó reducción de linfocitos B en ratones con un transgén (figura 24). No hubo cambios significativos para el nivel de linfocitos T y PMN durante el estudio.

Como demostración adicional del agente inmunoterapéutico alternativo descrito en la presente memoria, se construyó un equivalente de MGD261, llamado "2.4G2-3G8 DB". 2.4G2-3G8 DB es una molécula de redirección de afinidad doble (DART) que se une a mCD32B (mediante el anticuerpo 2.4G2) y hCD16A y hCD16B (mediante el anticuerpo h3G8).

La eficacia (reducción de linfocitos B) y toxicidad de 2.4G2-3G8 DB se ensayaron en ratones mCD16^{-/-}, mCD16^{-/-} hCD16A⁺ C57B1/6, mCD16^{-/-} hCD16B⁺ y mCD16^{-/-} hCD16A⁺ hCD16B⁺. Este experimento de dosis repetida, los ratones recibieron 9 inyecciones IP (tres veces a la semana durante 3 semanas). La reducción de linfocitos B se controló por FACS. La toxicidad se controló por observación dentro de la jaula.

Los datos indican que 2.4G2-3G8 DB puede reducir los linfocitos B en ratones transgénicos para hCD16 sin inducir ningún efecto secundario significativo.

Datos: a ratones mCD16^{-/-}, mCD16^{-/-} hCD16A⁺ C57B1/6, mCD16^{-/-} hCD16B⁺ y mCD16^{-/-} hCD16A⁺ hCD16B⁺ de la colonia de cría MacroGenics se les inyectó IP en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 DB 2.4G2-3G8 (75 ug/ratón), o PBS. Se recogió sangre en los días -10 (antes de la exanguinación) 4, 11 y 18 para análisis FACS. La salud del animal y la actividad se registraron tres veces a la semana.

Grupo	n.º de animales	Dosis µg/ms	Artículo de ensayo	Vía	Puntos temporales de recogida de sangre
A	2 mCD16 ^{-/-}	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
B	2 mCD16 ^{-/-} 16A ⁺ B6	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
C	2 mCD16 ^{-/-} 16B ⁺	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
D	2 mCD16 ^{-/-} 16A ⁺ 16B ⁺	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
E	6 mCD16 ^{-/-}	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Días -10, 4, 11, 18
F	6 mCD16 ^{-/-} 16A ⁺ B6	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Días -10, 4, 11, 18
G	6 mCD16 ^{-/-} 16B ⁺	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Días -10, 4, 11, 18
H	6 mCD16 ^{-/-} 16A ⁺ 16B ⁺	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Días -10, 4, 11, 18

Método de análisis FACS: Se recogieron muestras de sangre completa 10 días antes de la administración de 2.4G2-3G8 y 4, 11 y 18 días después del inicio del tratamiento. Las muestras de sangre se analizaron para determinar el efecto de 2.4G2-3G8 sobre los recuentos de linfocitos B mediante un ensayo basado en FACS. Se usó un protocolo sin lavado para el recuento de linfocitos B, linfocitos T y PMN usando tubos TruCOUNT, obtenidos de BD Immunocytometry System. El panel de anticuerpos usados en el análisis fue 1A8-FITC para PMN, CD3-PE para linfocitos T, CD19-APC para linfocitos B y CD45-PerCP para leucocitos totales.

Resultados

Los ratones tratados con hE16 o 2.4G2-3G8 DB no mostraban ningún signo de malestar en ningún momento durante el transcurso de la experimentación.

Se observó reducción de linfocitos B en ratones mCD16^{-/-} hCD16A⁺ o mCD16^{-/-} hCD16A⁺ hCD16B⁺, pero no en ratones mCD16^{-/-}. Estos datos indican que se necesitaban células efectoras que portaran hCD16A para la eliminación de linfocitos B (figura 25). No hubo cambios significativos para el nivel de linfocitos T y PMN durante el estudio.

Modelo intravenoso (IV): La actividad antitumoral de MGD261 se ensayó usando un modelo intravenoso (IV) de la línea celular de tumor humano Raji. Raji es una línea celular humana de linfoma de Burkitt que expresa hCD32B. Cuando se inyectan por vía intravenosa en ratones mCD16^{-/-}, hCD16A⁺, RAG1^{-/-}, las células tumorales se ubican en la columna y provoca parálisis de las extremidades posteriores.

Los datos indican que MGD261 puede bloquear el crecimiento de células tumorales Raji *in vivo* en ratones mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/- . Los datos indican que MGD261 puede usarse en el tratamiento de neoplasias de linfocitos B que expresan CD32B en el ser humano.

5 *Datos:* A ratones mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/- C57B1/6 de doce-veinte semanas de edad de la colonia de cría MacroGenics se les inyectó IV en el día 0 5×10^6 células Raji. En los días 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 y 30 los ratones también se trataron por vía intraperitoneal (IP) con 250, 25 o 2.5 ug de MGD261 o con PBS (control negativo). Los ratones entonces se observaron diariamente y se registró el peso corporal dos veces a la semana. Los ratones que desarrollaban parálisis de las extremidades posteriores se sacrificaron.

10 *Resultados:* Los ratones tratados con PBS murieron entre el día 25 y el día 50. Los ratones tratados con MGD261 sobrevivieron hasta el día 90 (figura 26). La supervivencia aumentada es estadísticamente significativa. Una comparación de curvas de supervivencia usando un ensayo del orden logarítmico dio una χ^2 de 96,46 (df 9; valor P < 0,0001).

6.7 Expresión de DART en procariotas

15 Se realizaron experimentos para demostrar la capacidad de producir DART en hospedadores que no son mamíferos. Por consiguientes, se transformó *Escherichia coli* con un plásmido que expresaba DART y se controló la expresión de DART.

Materiales y métodos:

20 *Construcción de plásmidos:* 3G8 es un anticuerpo monoclonal humanizado contra HuCD16. El DART descrito aquí consiste en dos cadenas unidas covalentemente, teniendo cada una de ellas un VL seguido de un espaciador, después un VH seguido de una Cys en un buen contexto para formar un enlace disulfuro con la cadena opuesta. La secuencia de DART que codifica 3G8VL-GlyGlyGlySerGlyGlyGlyGly (SEQ ID NO: 10)-3G8VH-LeuGlyGlyCys se amplificó por PCR a partir de una construcción de expresión eucariota existente y se digirió con Nco I y EcoR I. El vector diana fue pET25b (+) (Novagen), que contiene una secuencia líder de *pelB* para la secreción en *E. coli*. Antes de la inserción de las secuencias de DART 3G8/3G8, el vector se modificó de la siguiente manera: En primer lugar, 25 el promotor T7 se reemplazó por el promotor *lac* de menor actividad para favorecer la expresión soluble, aunque a menor nivel, de proteínas bajo este control. Adicionalmente, se introdujeron dos mutaciones puntuales para eliminar dos codones internos de Met presentes al principio del sitio de clonación múltiples (MCS) para favorecer el inicio en la Met presente al principio del líder de *pelB*. El DART que se produce por esta construcción consiste en dos brazos de región V que tienen la misma especificidad, concretamente HuCD16.

30 *Expresión:* Las células BL21DE3 (Novagen) se transformaron con el plásmido pET25b(+) T7-*lac*+ 3G8/3G8 y se usó una colonia resistente a amp para sembrar el caldo de cultivo. Cuando el cultivo alcanzó 0,5 unidades de DO 600, se añadió IPTG 0,5 mM para inducir la expresión. El cultivo se cultivó a 30 °C durante 2 horas y se recogió el medio sin células.

35 *Purificación:* El DART 3G8/3G8 se purificó en un proceso de dos etapas utilizando cromatografía de afinidad y de exclusión molecular. El DART se capturó del medio acondicionado usando cromatografía de afinidad. Específicamente, CD16A se acopló a Sepharose 4B activada con CNBr (GE Healthcare). La resina de CD16A-Sepharose se equilibró en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 antes de la carga. Tras completarse la carga, la resina se lavó con tampón de equilibrado antes de la elución del DART unido con glicina 50 mM pH 3,0. El DART eluido se neutralizó inmediatamente con Tris 1 M/HCl pH 8,0 y se concentró usando un concentrador de tipo centrifugación (Vivaspin 20, PES de 10 k de MWCO, VivaScience Inc.). El DART concentrado se purificó adicionalmente por 40 cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada en PBS.

Resultados

45 Se procesaron 1,7 litros de medio acondicionado de *E. coli* cultivada a través de la columna de CD16A-Sepharose. El rendimiento de DART fue 0,12 mg. El análisis del DART purificado por SDS-PAGE y SEC demostró equivalencia con el DART de control expresado en células de mamífero (CHO) (figura 27).

50 *ELISA de unión de DART h3G8-h3G8 expresado en E. coli:* La expresión del DART h3G8-h3G8 en *E. coli* se midió usando un ELISA. Se recubrieron 50 µl/pocillo de 2 µg/ml de anticuerpo 2C11 específico de Fv anti-h3G8 en placa Maxisorp de 96 pocillos en tampón carbonato a 4 °C durante una noche. La placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1 %) y después se bloqueó por BSA al 0,5 % en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir DART de ensayo. Durante el bloqueo, se diluyó el DART h3G8-h3G8 expresado en *E. coli*, DART h2B6-h3G8 y DART h2B6-h2B6 (control negativo) en 1 µg/ml y 0,3 µg/ml en PBST/BSA. Se añadieron 50 µl/pocillo de DART diluidos a cada pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS-T tres veces, se añadieron 50 µl/pocillo de 0,1 µg/ml de fusión de sCD16-Fc biotinilada a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS-T tres veces, se usaron 50 µl/pocillo de una dilución 1:5000 de HRP conjugada con estreptavidina (Amersham Pharmacia Biotech) para la 55 detección y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con PBS-T tres veces y se reveló

usando 80 μ l/pocillo de sustrato TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo mediante 40 μ l/pocillo de H_2SO_4 al 1 %. La DO 450 nm se leyó usando un lector de placa de 96 pocillos y el programa informático SOFTmax. La lectura se representó usando el programa informático GraphPadPrism 3.03 (figura 28).

6.8 Muerte de linfocitos B humanos inducida por DART

- 5 Se incubaron PBMC humanos durante una noche con: CD16-CD32B - hu3G8-hu2b6 (descrito anteriormente); anticuerpo 2B6 quimérico aglucosilado - ch2B6-agluc (descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente publicada como US2005/0260213) y CD16-CD79. Las secuencias de ADN y proteína codificada de CD16-CD79 son las siguientes:

H3G8VL-CB3.1VH

10 Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 226):

gacatcgtga	tgacccaatc	tccagactct	ttggctgtgt	ctctagggga	50
gagggccacc	atcaactgca	aggccagcca	aagtgttgat	tttgatggtg	100
atagttttat	gaactggtac	caacagaaac	caggacagcc	acccaaactc	150
ctcatctata	ctacatccaa	tctagaatct	gggtgccag	acagggttag	200
tggcagtggt	tctgggacag	acttcaccct	caccatcagc	agcctgcagg	250
ctgaggatgt	ggcagtttat	tactgtcagc	aaagtaatga	ggatccgtac	300
acgttcggac	aggggaccaa	gcttgagatc	aaaggaggcg	gatccggagg	350
cggagggccag	gtccaactgc	agcagcctgg	ggctgagctg	gtgaggcctg	400
gggcttcagt	gaagctgtcc	tgcaaggctt	ctggctacac	cttcaccagc	450
tactggatga	actgggtgaa	gcagaggcct	ggacaaggcc	ttgaatggat	500
tggtatggtt	gatccttcag	acagtgaac	tcactacaat	caaagtgtca	550
aggacaaggc	cacattgact	gttgacaaat	cctccagcac	agcctacatg	600
cagctcagca	gcctgacatc	tgaggactct	gcggtctatt	actgtgcaag	650
agctatgggc	tactggggtc	aaggaacctc	agtcaccgtc	tcctcagttg	700
agcccaaate	ttgt				714

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 227):

DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKASQSVD	FDGDSFMNWX	QQKPGQPPKL	50
LIYTTSNLES	GVPDRFSGSG	SGTDFTLTIS	SLQAEDVAVY	YCOQSNEDPY	100
TFGQGTKLEI	KGGSGGGGQ	VQLQQPGAEL	VRPGASVKLS	CKASGYTFTS	150
YWMNWKQRP	QGQLEWIGMV	DPSDSETHYN	QMFKDKATLT	VDKSSSTAYM	200
QLSSLTSEDS	AVYYCARAMG	YWGQGTSTVTV	SSVEPKSC		238

CB3.1VL-h3G8VH

15 Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 228):

gatgtttgta	tgacccagac	tccactcact	ttgtcgggta	acattggaca	50
accagcctcc	atctcttgta	agtcaagtca	gagcctctta	gatactgatg	100
gaaagacata	tttgaattgg	ttgttacaga	ggccaggcca	gtctccaaac	150
cgcctaactct	atctggtgtc	taaactggac	tctggagtcc	ctgacaggtt	200
cactggcagt	ggatcaggga	cagatttcac	actgaaaatc	agcagagtgg	250
aggctgagga	tttggaatt	tattattgct	ggcaagggtac	acattttccg	300
ctcacgttcg	gtgctgggac	caagctggag	ctgaaaggag	gcggatcccg	350
aggcggaggc	caggttaccc	tgagagagtc	tggcctgcgc	ctggtgaagc	400
ccacacagac	cctcacactg	acttgtacct	tctctggggtt	ttcactgagc	450
acttctggta	tgggtgttagg	ctggattcgt	cagcctcccg	ggaaggctct	500
agagtggctg	gcacacattt	ggtgggatga	tgacaagcgc	tataatccag	550
ccctgaagag	ccgactgaca	atctccaagg	atacctccaa	aaaccaggtg	600
gtcctcaciaa	tgaccaacat	ggaccctgtg	gatactgcca	catactactg	650
tgctcaaata	aaccccgccct	ggtttgctta	ctggggccaa	gggactctgg	700
tcactgtgag	ctcattcaac	aggggagagt	gt		732

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 229):

DVMTQTPLT	LSVNIGQPAS	ISCKSSQSLI	DTDGKTYLNV	LLQRPQSPN	50
RLIYLVSKLD	SGVPDRFTGS	SGTDFTLKI	SRVEAEDLGI	YYCWQGTTHF	100
LTFGAGTKLE	LKGGSGGGG	QVTLRESGPA	LVKPTQTLTL	TCTFSGFSL	150
TSGMGVGNIR	QPPGKALEWL	AHIWDDDKR	YNPALKSRLT	ISKDTSKNQV	200
VLTMTNMDPV	DTATYYCAQI	NPAWFAYWGQ	GTLTVTVSSFN	RGEC	244

- 20 La apoptosis se ensayó por análisis FACS como el porcentaje de la población PI+Anexina-V+ de linfocitos B (células CD20+) en la población total no seleccionada FSC/SSC. Figura 29).

6.9 DART 8B5-CB3.1

8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC

- 5 Se amplificó 8B5VL usando H9 e lgh630R como cebadores, ch8B5Lc como molde. Se amplificó CB3.1VH usando lgh628F e lgh629R como cebadores, ch8B5Hc como molde. La secuencia conectora se incorporó en los cebadores lgh630R e lgh628F. El conector del extremo C y el codón de parada se incorporaron en el cebador lgh629R. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron juntos en la misma relación molar, después se amplificaron usando H9 e lgh629R como cebadores. El producto de PCR solapado entonces se digirió con endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en vector pCIneo.

CB3.1VL-8B5VH-FNRGEC

- 10 Se amplificó CB3.1VL usando H9 e lgh630R, que compartían la misma secuencia que 8B5VL en FR4, como cebadores, y chCB3.1Lc como molde. Se amplificó 8B5VH usando lgh631F e lgh640R como cebadores, y ch8B5Hc como molde. La secuencia conectora se incorporó en los cebadores lgh630R e lgh631F. El conector del extremo C y el codón de parada se incorporaron en el cebador lgh640R. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron juntos en la misma relación molar, después se amplificaron usando H9 e lgh640R como cebadores.
- 15 producto de PCR solapado entonces se digirió con endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en vector pCIneo.

Marca antFLAG-8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC

- 20 La marca antFLAG se insertó entre la secuencia señal y 8B5VL por PCR solapante. La secuencia señal y la marca flag se amplificaron usando H9 e lgh647R como cebadores y ch8B5Lc como molde. Se volvió a amplificar 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC usando lgh647F e lgh629R como cebadores y 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC como molde. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron juntos en la misma relación molar, después se amplificaron usando H9 e lgh629R como cebadores. El producto de PCR solapado entonces se digirió con endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en vector pCIneo.

8B5VL-CB3.1VH-LGGC

- 25 Para generar un conector en el extremo C diferente en la construcción 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC, la construcción se volvió a amplificar usando H9 e lgh646R como cebadores. El conector LGGC del extremo C se integró en el cebador lgh646R. El producto de PCR entonces se digirió con endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en vector pCIneo.

CB3.1VL-8B5VH-LGGC

- 30 Se usó la misma estrategia para crear CB3.1VL-8B5VH-LGGC. El conector LGGC del extremo C se integró en el cebador lgh648R y CB3.1VL-8B5VH-FNRGEC se usó como molde. El producto de PCR entonces se digirió con endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en vector pCIneo.

Marca antFLAG-8B5VL-CB3.1VH-LGGC

- 35 Se usó también la misma estrategia para crear marca antFLAG-8B5VL-CB3.1VH-LGGC. El conector LGGC del extremo C se integró en el cebador lgh648R y marca antFLAG-8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC se usó como molde. El producto de PCR entonces se digirió con endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en vector pCIneo.

Secuencia de nucleótidos de 8B5-CB3.1-VEPKSC (SEQ ID NO: 230):

gacattcaga	tgacacagtc	tccatcctcc	ctacttgccg	cgctgggaga	50
aagagtcagt	ctcacttgtc	gggcaagtca	ggaaattagt	ggttacttaa	100
gctggcttca	gcagaaacca	gatggaacta	ttaaaccgct	gatctacgcc	150
gcattccactt	tagattcttg	tgtcccaaaa	aggttcagtg	gcagtgagtc	200
tgggtcagat	tattctctca	ccatcagcag	tcttgagtc	gaagattttg	250
cagactatta	ctgtctacaa	tattttagtt	atccgctcac	gttcggtgct	300
gggaccaagc	tggagctgaa	aggaggcgga	tccggaggcg	gaggccaggt	350
ccaactgcag	cagcctgggg	ctgagctggt	gaggcctggg	gcttcagtg	400
agctgtcctg	caaggcttct	ggctacacct	tcaccagcta	ctggatgaac	450
tgggtgaagc	agaggcctgg	acaaggcctt	gaatggattg	gtatggttga	500
tccttcagac	agtgaactc	actacaatca	aatgttcaag	gacaaggcca	550
cattgactgt	tgacaaatcc	tccagcacag	cctacatgca	gctcagcagc	600
ctgacatctg	aggactctgc	ggctctattac	tgtgcaagag	ctatgggcta	650
ctgggggtcaa	ggaacctcag	tcaccgtctc	ctcagttgag	cccaaattctt	700
gt					702

Secuencia de aminoácidos de 8B5-CB3.1-VEPKSC (SEQ ID NO: 231):

DIQMTQSPSS	LLAALGERVS	LTCRASQEIS	GYLSWLQQKP	DGTIKRLIYA	50
ASTLDSGVPK	RFGSGESGSD	YSLTISSLES	EDFADYYCLQ	YFSYPLTFGA	100
GTKLELKGKG	SGGGGQVQLQ	QPGAELVRPG	ASVKLSCKAS	GYTFTSYWMN	150
WVKQRPGQGL	EWIGMVDPSD	SETHYNQMFK	DKATLTVDKS	SSTAYMQLSS	200
LTSEDSAVYY	CARAMGYWGQ	GTSVTVSSVE	PKSC		234

Secuencia de nucleótidos de CB3.1-8B5-FNRGEC (SEQ ID NO: 232):

gatgttgtga	tgaccacagac	tccactcact	ttgtcgggta	acattggaca	50
accagcctcc	atctcttgtga	agtcaagtca	gagcctctta	gatactgatg	100
gaaagacata	tttgaattgg	ttgttacaga	ggccaggcca	gtctccaaac	150
cgcctaactct	atctgggtgac	taaaactggac	tctggagtc	ctgacaggtt	200
cactggcaggt	ggatcaggga	cagatttcac	actgaaaatc	agcagagtgg	250
aggctgagga	tttgggaatt	tattattgct	ggcaaggtag	acattttccg	300
ctcacgttcg	gtgctgggac	caagctggag	ctgaaaggag	gcggatccgg	350
aggcggaggc	gaagtgaagc	ttgaggagtc	tggaggaggc	ttggtgcaac	400
ctggaggatc	catgaaactc	tcttgtgaag	cctctggatt	cacttttagt	450
gacgcctgga	tggactgggt	cgcctcagtc	ccagagaagg	ggcttgagtg	500
ggttgctgaa	attagaaaca	aagctaaaaa	tcatgcaaca	tactatgctg	550
agtcctgtgat	agggagggtc	accatctcaa	gagatgattc	caaaagtagt	600
gtctacctgc	aaatgaacag	cttaagagct	gaagacactg	gcatttatta	650
ctgtggggct	ctgggctctg	actactgggg	ccaaggcacc	actctcacag	700
tctctcgtt	caacagggga	gagtggt			726

5

Secuencia de aminoácidos de CB3.1-8B5-FNRGEC (SEQ ID NO: 233):

DVVMQTPLT	LSVNIGQPAS	ISCKSSQSL	DTDGKTYLNW	LLQRPQGSPN	50
RLIYLVSKLD	SGVPDRFTGS	SGTDFTLKI	SRVEAEDLGI	YCWQGTTHFP	100
LTFGAGTKLE	LKGGSGGGG	EVKLEESGGG	LVQPGGSMKL	SCEASGFTFS	150
DAWMDWVRQS	PEKGLEWVAE	IRNKAKNHAT	YYAESVIGRF	TISRDDSKSS	200
VYLQMNLSRA	EDTGIYYCGA	LGLDYWGQGT	TLTVSSFNRG	EC	242

8B5VL-CB3.1VH-LGGC

10

Se amplificó 8B5VL usando H9 e lgh694R como cebadores, ch8B5Lc como molde. Se amplificó 8B5VH usando lgh695F e lgh696R como cebadores, ch8B5Hc como molde. La secuencia conectora se incorporó en los cebadores lgh694R e lgh695F. Se amplificó HulgG1Fc usando lgh355F e lgh366R como cebadores, ch8B5Hc como molde. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron juntos en la misma relación molar, después se amplificaron usando H9 e lgh366R como cebadores. El producto de PCR solapado entonces se digirió con endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en vector pCIneo.

15

Secuencia de nucleótidos de 8B5VL-CB3.1VH-LGGC (SEQ ID NO: 234):

gacattcaga	tgacacagtc	tccatctctc	ctacttgagg	cgctgggaga	50
aagagtcagt	ctcacttgct	gggcaagtca	ggaaattagt	ggttacttaa	100
gctggcttca	gcagaaacca	gatggaacta	ttaaaccgct	gatctacgcc	150
gcattccactt	tagattctgg	tgtcccaaaa	aggttcagtg	gcagtgagtc	200
tgggtcagat	tattctctca	ccatcagcag	tcttgagtc	gaagattttg	250
cagactatta	ctgtctctaa	tatttttagtt	atccgctcac	gttcgggtgct	300
gggaccaagc	tggagctgaa	aggaggcgga	tccggaggcg	gaggccaggt	350
ccaactgcag	cagcctgggg	ctgagctggg	gaggcctggg	gcttcagtga	400
agctgtcctg	caaggcttct	ggctacacct	tcaccagcta	ctggatgaac	450
tgggtgaagc	agaggcctgg	acaaggcctt	gaatggattg	gtatggttga	500
tccttcagac	agtgaactc	actacaatca	aatgttcaag	gacaaggcca	550
cattgactgt	tgacaaatcc	tccagcacag	cctacatgca	gctcagcagc	600
ctgacatctg	aggactctgc	ggctctattac	tgtgcaagag	ctatgggcta	650
ctgggggtcaa	ggaacctcag	tcaccgtctc	ctcactggga	ggctgc	696

Secuencia de aminoácidos de 8B5VL-CB3.1VH-LGGC (SEQ ID NO: 235):

DIQMTQSPSS	LLAALGERVS	LTCRASQEIS	GYLSWLQQKP	DGTIKRLIYA	50
ASTLDSGVPK	RFGSGESGSD	YSLTISSLES	EDFADYYCLQ	YFSYPLTFGA	100
GTKLELKGKG	SGGGGQVQLQ	QPGAELVRPG	ASVKLSCKAS	GYTFTSYWMN	150
WVKQRPGQGL	EWIGMVDPSD	SETHYNQMFK	DKATLTVDKS	SSTAYMQLSS	200
LTSEDSAVYY	CARAMGYWGQ	GTSVTVSSLG	GC		232

Secuencia de nucleótidos de CB3.1-8B5-LGGC (SEQ ID NO: 236):

gatgttgtga	tgaccagac	tccactcact	ttgtcgggta	acattggaca	50
accagcctcc	atctcttcta	agtcaagta	gagcctctta	gatactgatg	100
gaaagacata	tttgaatttg	ttgttacaga	ggccaggcca	gtctccaaac	150
cgccctaact	atctgggtgc	taaactggac	tctggagtc	ctgacaggtt	200
cactggcagt	ggatcaggga	cagatttcac	actgaaaatc	agcagagtgg	250
aggctgagga	tttggaatt	tattattgct	ggcaaggtag	acattttccg	300
ctcacgttcg	gtgctgggac	caagctggag	ctgaaaggag	gcggatccgg	350
aggcggagga	gaagtgaagc	ttgaggagtc	tggaggaggc	ttggtgcaac	400
ctggaggatc	catgaaactc	tcttgtgaag	cctctggatt	cacttttagt	450
gacgcctgga	tggactgggt	ccgtcagctc	ccagagaagg	ggcttgagtg	500
ggttgcgtga	attagaaaca	aagctaaaaa	tcatgcaaca	tactatgctg	550
agtctgtgat	aggaggttc	accatctcaa	gagatgattc	caaaagtagt	600
gtctacctgc	aatgaacag	cttaagagct	gaagacactg	gcatttatta	650
ctgtggggct	ctgggccttg	actactgggg	ccaaggcacc	actctcacag	700
tctcctcgct	gggaggctgc				720

Secuencia de aminoácidos de CB3.1-8B5-LGGC (SEQ ID NO: 237):

DVVMQTPLT	LSVNIGQPAS	ISCKSSQSL	DTDGKTYLNW	LLQRPQSPN	50
RLIYLVSKLD	SGVPDRFTGS	SGTDFTLKI	SRVEAEDLGI	YYCWQGTFFP	100
LTFGAGTKLE	LKGGGSGGGG	EVKLEESGGG	LVQPGGSMKL	SCEASGFTFS	150
DAWMDWVRQS	PEKLEWVAE	IRNKAKNHAT	YYAESVIGRF	TISRDDSKSS	200
5 VYLQMNLSRA	EDTGIYYCGA	LGLDYWGQGT	TLTVSSLGGC		240

Cebadores:

Lgh628F (SEQ ID NO: 238):

ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtc caactgcagc agcctgg 47

Lgh629R (SEQ ID NO: 239):

10 tttgaattct aacaagattt gggctcaact gaggagacgg tgactgagg 49

Lgh630R (SEQ ID NO: 240):

gcctccgcct ccggatccgc ctctttcag ctccagcttg gtccc 45

Lgh631F (SEQ ID NO: 241):

ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg aagcttgagg agtctgg 47

15 Lgh640R (SEQ ID NO: 242):

tttgaattct aacactctcc cctgttgaac gaggagactg tgagagtgg 49

Lgh644R (SEQ ID NO: 243):

ttgtcgtca tcatgctctt ttagtcgga gtggacacct gtggagag 48

Lgh646R (SEQ ID NO: 244):

20 tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgactg ag 42

Lgh647F (SEQ ID NO: 245):

caaagacgat gatgacgaca aagacattca gatgacacag tctcc 45

Lgh648R (SEQ ID NO: 246):

tttgaattct agcagcctcc cagcaggag actgtgagag tgg 43

25 *Expresión:* La construcción 5 y 6, o 6 y 7, o 8 y 9, o 9 y 10, codificadas en plásmidos de expresión (figura 30) se contranfectaron en células HEK-293 para que expresaran DART 8B5-CB3.1 con o sin marca antilflag usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). El medio acondicionado se recogió cada tres días por tres veces. El medio acondicionado entonces se purificó usando columna de afinidad por CD32B.

ELISA: El ELISA se realizó de la siguiente manera: Se recubrieron 50 µl/pocillo de 2 µg/ml de CD32B-Fc en placa Maxisorp de 96 pocillos en tampón carbonato a 4 °C durante una noche. La placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1 %) y después se bloqueó por BSA al 0,5 % en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir proteína de fusión de Fc monocatenaria de ensayo. Durante el bloqueo, se diluyó el DART 8B5-CB3.1 en una dilución de factor dos empezando a 2 µg/ml. Se transfirieron 25 µl/pocillo de DART diluido mezclado con 25 µl/pocillo de 50 ng/ml de ch8B5 de la placa de dilución a la placa de ELISA. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS-T tres veces, se añadieron 50 µl/pocillo del F(ab')₂ de cabra anti-F(ab')₂ de IgG humano conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) diluido 1:10 000 a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con PBS-T tres veces y se reveló con 80 µl/pocillo de sustrato TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo mediante 40 µl/pocillo de H₂SO₄ al 1 %. La DO 450 nm se leyó usando un lector de placa de 96 pocillos y el programa informático SOFTmax. La lectura se representó usando el programa informático GraphPadPrism 3.03 (figura 31).

6.10 Diseño y caracterización de DART tetravalente de tipo Ig

Se emplearon cuatro cadenas polipeptídicas para producir una especie de DART de tipo Ig que tiene sitios tetravalentes de unión a antígeno (figura 32; figura 33). La especie de DART de tipo Ig tiene propiedades únicas, ya que sus dominios pueden diseñarse para que se unan al mismo epítipo (para formar un DART de tipo Ig tetravalente, específico para un epítipo que puede unirse a cuatro moléculas antigénicas idénticas), o a diferentes epítopos o antígenos. Por ejemplo, sus dominios pueden diseñarse para que se unan a dos epítopos del mismo antígeno (para formar un DART de tipo Ig tetravalente, específico para un antígeno, específico para dos epítopos), o a epítopos de diferentes moléculas antigénicas para formar un DART de tipo Ig tetravalente que tiene un par de sitios de unión específicos para un primer antígeno y un segundo par de sitios de unión específicos para un segundo antígeno). Pueden producirse fácilmente moléculas híbridas que tienen combinaciones de dichos tributos.

Para ilustrar las características de dicha especie de DART de tipo Ig, se produjo una especie de DART de tipo Ig tetravalente ejemplar que tiene un par de sitios de unión específicos para CD32 y un segundo par de sitios de unión específicos para CD16A. Esta especie de DART de tipo Ig se produjo usando las cuatro siguientes cadenas polipeptídicas:

Secuencia de nucleótidos de 2.4G2-3G8-hKappa

(SEQ ID NO: 247):

gatgtccaga	tgaccagctc	tccatctaata	cttgcctgctt	ctcctggaga	50
aagtgtttcc	atcaattgca	aggcaagtga	gagcatttagc	aagtatttag	100
cctggatatct	acagaaacct	gggaaagcaa	ataagcttctt	tatgtacgat	150
gggtcaactt	tgcaatctgg	aattccatcg	aggttcagtg	gcagtggatc	200
tggtacagat	ttcactctca	ccatcagaag	cctggagcct	gaagattttg	250
gactctatta	ctgtcaacag	cattatgaat	atccagccac	gttcggttct	300
gggaccaagc	tggagatcaa	aggagcgga	tccggaggcg	gaggccaggt	350
taccttgaaa	gagtctggcc	ctgggatatt	gcagccctcc	cagaccctca	400
gtctgacttg	ttctttctct	gggttttcac	tgaggacttc	tggtatgggt	450
gtaggctgga	ttcgtcagcc	ttcagggaag	ggtctagagt	ggctggcaca	500
catttggtgg	gatgatgaca	agcgtataa	tccagccctg	aagagccgac	550
tgacaatctc	caaggatacc	tccagcaacc	aggtattcct	caaaatcgcc	600
agtgtggaca	ctgcagatac	tgccacatac	tactgtgctc	aaataaaccc	650
cgcttggttt	gcttactggg	gccaaaggac	tctggteact	gtgagctcac	700
tgggaggtcg	cggcgagggg	agccgtacgg	tggctgcacc	atcgggtctt	750
atcttcccgc	catctgatga	gcagttgaaa	tctggaactg	cctctgttgt	800
gtgctgtctg	aataacttct	atcccagaga	ggccaaagta	cagtgggaag	850
tgataaacgc	cctccaatcg	ggtaactccc	aggagagtgt	cacagagcag	900
gacagcaagg	acagcaccta	cagcctcagc	agcaccctga	cgtctgagcaa	950
agcagactac	gagaaacaca	aagtctacgc	ctgcgaagtc	acccatcagg	1000
gcctgagctc	gcccgtcaca	aagagcttca	acaggggaga	gtgt	1044

Secuencia de aminoácidos codificada de 2.4G2-3G8-hKappa

(SEQ ID NO: 248):

DVQMTQSPSN	LAASPGESVS	INCKASESIS	KYLAWYLQKP	GKANKLLMYD	50
GSTLQSGIPS	RFSGSGSGTD	FTLTIRSLP	EDFGLYYCQQ	HYEYPATFGS	100
GTKLEIKGGG	SGGGGQVTLK	ESGPGILQPS	QTLSTLCSFS	GFSLRTSGMG	150
VGWIRQPSGK	GLEWLAHIW	DDDKRYNPAL	KSRLTISKDT	SSNQVFLKIA	200
SVDTADTATY	YCAQINPAWF	AYWGQGTIVT	VSSILGGCGG	SRTVAAPSVF	250
IFPPSDEQLK	SGTASVVCLL	NNFYFREAKV	QWKVDNALQS	GNSQESVTEQ	300
DSKDYSTYSL	STLTLSKADY	EKKHKVYACEV	THQGLSSPVT	KSFNRGEC	350

Secuencia de nucleótidos de 3G8-2.4G2-hG1

(SEQ ID NO: 249):

gacactgtgc	tgaccaaatc	tccagcttct	ttggtgtgtg	ctctagggca	50
gagggccacc	atctcctgca	aggccagcca	aagtgttgat	tttgatgggtg	100
atagttttat	gaactgggtac	caacagaaac	caggacagcc	acccaaactc	150
ctcatctata	ctacatccaa	tctagaatct	gggatcccag	ccagggtttag	200
tgccagtggg	tctgggacag	acttcaccct	caacatccat	cctgtggagg	250
aggaggatac	tgcaacctat	tactgtcagc	aaagtaatga	ggatccgtac	300
acgttcggag	gggggaccaa	gctggaaata	aaaggaggcg	gatccggagg	350
cggaggcgag	gtggagctag	tggagtctgg	gggaggctta	gtgcagcctg	400
gaaggtccct	gaaactctcg	tgtgcagcct	caggattcac	tttcagtgtac	450
tattacatgg	cctgggtccg	gcaggctcca	acgacgggtc	tggagtgggt	500
cgcattccatt	agtatatgat	gtggtgacac	tcactatcga	gactccgtga	550
agggccgatt	tactattttcc	agagataatg	caaaaagcag	cctatacctg	600
caaattggaca	gtctgagggtc	tgaggacacg	gccatttatt	actgtgcaac	650
agagactacg	ggaataccta	caggtgttat	ggatgcctgg	ggtcaaggag	700
tttcagtgtac	tgtctcctca	ctgggaggct	gcggcggagg	gagcgcctcc	750
accaagggcc	catcgggtctt	ccccttgcca	ccctcctcca	agagcacctc	800
tgggggcaca	cgggcctctgg	gctgcctggg	caaggactac	ttccccgaac	850
cgggtgacgt	gtcgtggaac	tcaggcgccc	tgaccagcgg	cgtgcacacc	900
ttcccggtcg	tcctacagtc	ctcaggactc	tactccctca	gcagcgtggg	950
gaccgtgccc	tccagcagct	tgggcaccca	gacctacatc	tgcaacgtga	1000
atcacaaaggc	cagcaaacacc	aaggtggaca	agagagttga	gccccaatct	1050
tgtgacaaaa	ctcacacatg	cccaccgtgc	ccagcacctg	aactcctggg	1100
gggaccgtca	gtcttctctct	ccccccaaa	acccaaggac	accctcatga	1150
tctcccgga	ccctgagggtc	acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	1200
gacctctgag	tcagtttcaa	ctggtacgtg	gacggcgtgg	aggtgcataa	1250
tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	taccgtgtgg	1300
tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtac	1350
aagtgcaagg	tctccaacaa	agccctccca	gccccatcg	agaaaaccat	1400
ctccaaaggc	aaagggcagc	cccagaaacc	acaggtgtac	accctgcccc	1450
catcccgga	tgagctgacc	aagaaccagg	tcagcctgac	ctgctgtgtc	1500
aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	gagtgaggga	gcaatgggca	1550
gcgggagaa	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	tccgacggct	1600
ccttcttct	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	1650
gggaacgtct	tctcatgtct	cgtgatgcat	gaggtctctg	acaaccacta	1700
cacgcagaag	agcctctccc	tgtctccggg	taaa		1734

Secuencia de aminoácidos codificada de 3G8-2.4G2-hG1

(SEQ ID NO: 250):

DTVLTQSPAS	LAVSLGQRAT	ISCKASQSVD	FDGDSFMNWX	QQKPGQPPKL	50
LIYTTNLES	GI PARFSASG	SGTDFTLNIH	PVEEEDTATY	YCQSNEDPY	100
TFGGGTKLEI	KGGSGGGGE	VELVESGGGL	VQGRSLKLS	CAASGFTFSD	150
YYMAWRQAP	TGLEWVASI	SYDGGDTHYR	DSVKGRFTIS	RDNAKSSLYL	200
QMDSLRSED	ATYYCATETT	GIPTGVMDAW	GQGVSVTVSS	LGGCGGGSAS	250
TKGPSVFPLA	PSSKSTSGGT	AALGCLVKDY	FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT	300
FPAVLQSSGL	YSLSSVTVTP	SSSLGTQTYI	CNVNHKPSNT	KVDKRVEPKS	350
CDKTHTCPPC	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVDVDSHE	400
DPEVKFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	450
KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSRDEL	KNQVSLTCLV	500
KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTTPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	550
GNVFSCSVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPGK			578

Se obtuvieron preparaciones de moléculas DART de tipo Ig que tienen las secuencias anteriores a partir de diferentes aislados plasmídicos y se denominaron "Ig DART 1" e "Ig DART 2". La capacidad de estas especies de DART de tipo Ig de unirse a mCD32-hCD16A en un ELISA se comparó con la de medio en solitario, un DART que tiene un solo sitio de unión a CD32 y un solo sitio de unión a CD16A ("DART"), y mAb anti-ch-mCD32 de control (figura 34). Se descubrió que el DART de tipo Ig de la presente divulgación tenía afinidad de unión a antígeno mucho mayor que el DART o el anticuerpo de control.

6.11 Diseño y caracterización de diacuerpos biespecíficos para CD32B-CD79-1 y CD32B-CD79-2

Los genes que codifican CD79VL-CD32BVH (secuencia 1), CD32BVL-CD79VH-1 (secuencia 2) y CD32BVL-CD79VH-2 (secuencia 3) se clonaron en el vector de expresión pEE13 que provoca la expresión de las construcciones 1, 2 y 3, respectivamente. El plásmido de expresión de la construcción 1 se cotransfectó junto con el

plásmido de expresión 2 o 3 en células HEK-293 para generar los diacuerpos biespecíficos para CD32B-CD79-1 y CD32B-CD79-2, respectivamente. El medio acondicionado se recogió cada tres días por tres veces. El medio acondicionado entonces se purificó usando columna de afinidad por CD32B.

El ELISA se realizó de la siguiente manera: Se recubrieron 50 µl/pocillo de 2 µg/ml de CD32B-Fc en placa Maxisorp de 96 pocillos en tampón carbonato a 4 °C durante una noche. La placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1 %) y después se bloqueó por BSA al 0,5 % en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir proteína de fusión de Fc monocatenaria de ensayo. Durante el bloqueo, se diluyó el diacuerpo biespecífico para CD32B-CD79-1 o CD32B-CD79-2 en una dilución de factor dos empezando a 2 µg/ml. Se mezclaron 25 µl/pocillo del diacuerpo biespecífico diluido con 25 µl/pocillo de 50 ng/ml de anticuerpo anti-CD32B y se añadieron a una placa de ELISA. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS-T tres veces, se añadieron 50 µl/pocillo del F(ab')₂ de cabra anti-F(ab')₂ de IgG humano conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) diluido 1:10 000 a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con PBS-T tres veces y se reveló con 80 µl/pocillo de sustrato TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo mediante 40 µl/pocillo de H₂SO₄ al 1 %. La DO 450 nm se leyó usando un lector de placa de 96 pocillos y el programa informático SOFTmax. La lectura se representó usando el programa informático GraphPadPrism 3.03. El experimento reveló que los diacuerpos específicos para CD32B-CD79-1 y CD32B-CD79-2 podían unirse inmunespecíficamente a CD32-Fc con una afinidad equivalente a la del anticuerpo de control anti-CD32B. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos codificadas de las construcciones descritas anteriormente se proporcionan a continuación:

Secuencia 1 - secuencia de nucleótidos de CD79VL-CD32BVH

(SEQ ID NO: 251):

gatgttgtga	tgactcagtc	tccactctcc	ctgcccgtca	cccttgga	50
gccggcctcc	atctcctgca	agtcaagtc	gagcctctta	gatagtgtatg	100
gaaagacata	tttgaattgg	tttcagcaga	ggccaggcca	atctccaaac	150
cgcctaattt	atctgggtgc	taaaactggac	tctgggggtcc	cagacagatt	200
cagcggcagt	gggtcaggca	ctgatttcac	actgaaaatc	agcagggtgg	250
aggctgagga	tgttgggggtt	tattactgct	ggcaaggtag	acattttccg	300
ctcacgttcg	gcggaggagc	caagcttgag	atcaaaggag	gcggatccgg	350
aggcggaggc	gaagtgaagc	ttgaggagtc	tggaggaggc	ttggtgcaac	400
ctggaggatc	catgaaatc	tcttgtgaag	cctctggatt	cacttttagt	450
gacgcctgga	tggactgggt	cogtcagtc	ccagagaagg	ggcttgagtg	500
ggttgctgaa	attagaaaca	aagctaaaa	tcatgcaaca	tactatgctg	550
agtctgtgat	agggagggttc	accatctcaa	gagatgattc	caaaagtagt	600
gtctacctgc	aaatgaacag	cttaagagct	gaagacactg	gcattttatta	650
ctgtggggct	ctgggccttg	actactgggg	caaaggcacc	actctcacag	700
tctctcgcgt	gggaggctgc				720

Secuencia 2 - secuencia de aminoácidos de CD79VL-CD32BVH

(SEQ ID NO: 252):

DVVMTSPLS	LPVTLGPAS	ISCKSSQSL	DSGKTYLW	FQQRPGQSPN	50
RLIYLVSKLD	SGVPDRFSGS	SGTDFTLKI	SRVEAEDGV	YYCWQGFTHP	100
LTFGGGTKLE	IKGGGSGGGG	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	150
DAWMDWVRQA	PGGLEWVAE	IRNKAHNHAT	YYAESVIGRF	TISRDDAKNS	200
LYLQMNLSRA	EDTAVYYCGA	LGLDYWGQGT	LVTVSSLGGC		240

Secuencia 3 - secuencia de nucleótidos de CD32BVL-CD79VH-1

(SEQ ID NO: 253):

gacatccaga	tgaccacagtc	tccatcctcc	ttatctgcct	ctgtgggaga	50
tagagtcacc	atcacttgct	gggcaagtc	ggaattaggt	ggttacttaa	100
gctggctgca	gcagaaacca	ggcaaggccc	ctagacgcct	gatctacgcc	150
gcatccactt	tagattctgg	tgtcccatcc	aggttcagtg	gcagtgagtc	200
tgggaccgag	ttacacctca	ccatcagcag	ccttcagcct	gaagattttg	250
caacctatta	ctgtctacaa	tatttttagtt	atccgctcac	gttcggagggg	300
gggaccaagg	tggaaataaa	aggaggcgga	tccggaggcg	gaggccaggt	350
tcagctgggtg	cagtctggag	ctgaggtgaa	gaagcctggc	gcctcagtga	400
aggtctcctg	caaggcttct	ggttacacct	ttaccagcta	ctggatgaac	450
tgggtgcgac	aggcccttg	acaaggcctt	gagtggatcg	gaatgattga	500
tccttcagac	agtgaactc	actacaatca	aatgttcaag	gacagagtc	550
ccatgaccac	agacacatcc	acgagcacag	cctacatgga	gctgaggagc	600
ctgagatctg	acgacacggc	cgtgtattac	tgtgcgagag	ctatggggcta	650
ctgggggcaa	gggaccacgg	tcaccgtctc	ctcactggga	ggctgc	696

Secuencia 4 - secuencia de aminoácidos de CD32BVL-CD79VH-1**(SEQ ID NO: 254):**

DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQEIS	GYLSWLQKPK	GKAPRRLIYA	50
ASTLDSGVPS	RFSGESSEGE	FTLTISLQF	EDFATYYCLQ	YFSYPLTFGG	100
GTKVEIKGGG	SGGGGQVQLV	QSGAEVKKPG	ASVKVSCSKAS	GYTFTSYWMN	150
WVRQAPGQGL	EWIGMIDPSD	SETHYNQMFK	DRVTMTDTS	TSTAYMELRS	200
LRSDDTAVYY	CARAMGYWGQ	GTTVTVSSLG	GC		232

Secuencia 5 - secuencia de nucleótidos de CD32BVL-CD79VH-2**(SEQ ID NO: 255):**

gacatccaga	tgaccacagtc	tccatcctcc	ttatctgcct	ctgtgggaga	50
tagagtcacc	atcacttgct	gggcaagtc	ggaattaggt	ggttacttaa	100
gctggctgca	gcagaaacca	ggcaaggccc	ctagacgcct	gatctacgcc	150
gcatccactt	tagattctgg	tgtcccatcc	aggttcagtg	gcagtgagtc	200
tgggaccgag	ttacacctca	ccatcagcag	ccttcagcct	gaagattttg	250
caacctatta	ctgtctacaa	tatttttagtt	atccgctcac	gttcggagggg	300
gggaccaagg	tggaaataaa	aggaggcgga	tccggaggcg	gaggccaggt	350
tcagctgggtg	cagtctggag	ctgaggtgaa	gaagcctggc	gcctcagtga	400
aggtctcctg	caaggcttct	ggttacacct	ttaccagcta	ctggatgaac	450
tgggtgcgac	aggcccttg	acaaggcctt	gagtggatcg	gaatgattga	500
tccttcagac	agtgaactc	actacaatca	aaagttcaag	gacagagtc	550
ccatgaccac	agacacatcc	acgagcacag	cctacatgga	gctgaggagc	600
ctgagatctg	acgacacggc	cgtgtattac	tgtgcgagag	ctatggggcta	650
ctgggggcaa	gggaccacgg	tcaccgtctc	ctcactggga	ggctgc	696

Secuencia 6 - secuencia de aminoácidos de CD32BVL-CD79VH-2**(SEQ ID NO: 256):**

DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQEIS	GYLSWLQKPK	GKAPRRLIYA	50
ASTLDSGVPS	RFSGESSEGE	FTLTISLQF	EDFATYYCLQ	YFSYPLTFGG	100
GTKVEIKGGG	SGGGGQVQLV	QSGAEVKKPG	ASVKVSCSKAS	GYTFTSYWMN	150
WVRQAPGQGL	EWIGMIDPSD	SETHYNQKFK	DRVTMTDTS	TSTAYMELRS	200
LRSDDTAVYY	CARAMGYWGQ	GTTVTVSSLG	GC		232

6.12 Construcción y optimización de diacuerpos bifuncionales H8B5-HBCRC

10 Se construyó un diacuerpo que contiene regiones variables que pueden unirse a CD32 y el complejo receptor de linfocitos B ("BCRC").

Clonación. Las construcciones se construyeron usando PCR convencional/PCR solapante:

h8B5VL-G3SG4-hBCRCVH M48I-LGGC:

15 Se amplificó un 8B5 VL completamente humanizado (que reconoce CD32) usando Igh321F e Igh788R como cebadores. Se amplificó hBCRCVH M48I usando Igh784F e Igh386R como cebadores. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron juntos y se amplificaron usando Igh321F e Igh386R. El fragmento de PCR solapante entonces se clonó en pEE6 en el sitio XbaI-EcoRI. "G3SG4" es un conector que tiene la secuencia: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10).

hBCRCVL R45N-G3SG4-h8B5VH-LGGC

Se amplificó el hBCRCVL R45N usando lgh321F e lgh785R como cebadores. Se amplificó el h8B5VH usando lgh787F e lgh786R como cebadores. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron juntos y se amplificaron usando lgh321F e lgh786R. El fragmento de PCR solapante entonces se clonó en pEE13 en el sitio XbaI-EcoRI.

Construcción de vector individual. El pEE6hHBCRCVL R45N-h8B5VH se digirió en los sitios Bgl II-Sal I y se purificó un fragmento de 3,3 kb y se insertó en pEE13 hHBCRCVL 45N-h8B5VH en sitios BamHI-Sall. Bgl II y BamH I comparten extremos cohesivos compatibles. La secuencia del DART y los cebadores para construir el DART se representan a continuación:

Secuencia de nucleótidos de hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC

(SEQ ID NO: 257):

gatgttgtga	tgactcagtc	tccactctcc	ctgcccgtca	cccttgga	50
gccggcctcc	atctcctgca	agtcaagtc	gagcctctta	gatagtgatg	100
gaaagacata	tttgaattgg	tttcagcaga	ggccaggcca	atctccaaac	150
cgcctaattt	atctgggtgtc	taaaactggac	tctgggggtcc	cagacagatt	200
cagcggcagt	gggtcaggca	ctgatttcac	actgaaaatc	agcagggtgg	250
aggctgagga	tgttgggggt	tattactgct	ggcaaggtag	acattttccg	300
ctcacgttcg	gcggaggggac	caagcttgag	atcaaaggag	gcggatccgg	350
aggcggaggc	gaagtgaagc	ttgaggagtc	tgaggagggc	ttggtgcaac	400
ctggaggatc	catgaaactc	tcttgtgaag	cctctggatt	cacttttagt	450
gacgcctgga	tggactgggt	ccgtcagttc	ccagagaagg	ggcttgagtg	500
ggttgctgaa	attagaaaca	aagctaaaaa	tcatgcaaca	tactatgctg	550
agtctgtgat	agggaggttc	accatctcaa	gagatgattc	caaaagtagt	600
gtctacctgc	aaatgaacag	cttaagagct	gaagacactg	gcatttatta	650
ctgtggggct	ctgggccttg	actactgggg	ccaaggcacc	actctcacag	700
tctcctcgct	gggaggctgc				720

Secuencia de aminoácidos de hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC

(SEQ ID NO: 258):

DVVMTQSPLS	LPVTLGQPAS	ISCKSSQSLL	DSDGKTYLNV	FQQRPGQSPN	50
RLIYLVSKLD	SGVPDRFSGS	SGSTDFTLKI	SRVEAEDVGV	YYCWQGTHFP	100
LTFGGGTKLE	IKGGGSGGGG	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	150
DAWMDWVRQA	PGKGLEWVAE	IRNKAKNHAT	YYAESVIGRF	TISRDDAKNS	200
LYLQMNLSRA	EDTAVYYCGA	LGLDYWQGGT	LVTVSSLGGC		240

Secuencia de nucleótidos de H8B5VL-hHBCRCVH M48I-LGGC

(SEQ ID NO: 259):

gacatccaga	tgaccagtc	tccatcctcc	ttatctgcct	ctgtgggaga	50
tagagtcacc	atcaattgtc	gggcaagtc	ggaaattagt	ggttacttaa	100
gctggctgca	gcagaaacca	ggcaaggccc	ctagacgcct	gatctacgcc	150
gcatccactt	tagattctgg	tgtcccatcc	aggttcagtg	gcagtgagtc	200
tgggaccgag	ttcaccctca	ccatcagcag	ccttcagcct	gaagattttg	250
caacctatta	ctgtctacaa	tatttttagtt	atccgctcac	gttcggaggg	300
gggaccaagg	tggaaataaa	aggaggcggg	tccggaggcg	gaggccaggt	350
tcagctgggtg	cagtctggag	ctgaggtgaa	gaagcctggc	gcctcagtga	400
aggctctcctg	caaggcttct	ggttacacct	ttaccagcta	ctggatgaac	450
tgggtgcgac	aggcccctgg	acaagggctt	gagtggatcg	gaatgattga	500
tccttcagac	agtgaactc	actacaatca	aatgttcaag	gacagagtca	550
ccatgaccac	agacacatcc	acgagcacag	cctacatgga	gctgaggagc	600
ctgagatctg	acgacacggc	cgtgtattac	tgtgcgagag	ctatgggcta	650
ctgggggcaa	gggaccacgg	tcaccgtctc	ctcactggga	ggctgc	696

Secuencia de aminoácidos de H8B5VL-HBCRCVH M48I-LGGC

(SEQ ID NO: 260):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA	50
ASTLDSGVPS RFGSGESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG	100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCAS GYTFTSYWMN	150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQMFK DRVTMTDTS TSTAYMELRS	200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC	232

Cebador Lgh321F (SEQ ID NO: 261):

cgagctagct ctatgaga tcacagtct ctctac 36

Cebador Lgh386R (SEQ ID NO: 262):

5 ttgaattct agcagcctcc cagtggagg acggtgaccg tggc 45

Cebador Lgh784F (SEQ ID NO: 263):

ggcggatccg gaggcggagg ccaggttcag ctggtgcag 39

Cebador Lgh785R (SEQ ID NO: 264):

cctccgcatc cgctctctt gatctcaagc ttggtccc 38

10 Cebador Lgh786R (SEQ ID NO: 265):

ttgaattct agcagcctcc caggctggag acggtcacca gg 42

Cebador Lgh787F (SEQ ID NO: 266):

ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg cagctgtgg agtc 44

15 El plásmido de expresión de Hu3G8VL1-G3SG4-Hu2B6VH 4-LGGC se cotransfectó con Hu2B6VL5-G3SG4-Hu3G8VH5-LGGC en células HEK-293 para generar el diacuerpo biespecífico Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1 que reconoce CD32 y CD79. Al mismo tiempo, Hu2B6VL 5-G3SG4-Hu2B6VH 4-LGGC y Hu3G8VL 1-G3SG4-Hu3G8VH 5-LGGC se transfectaron individualmente en células HEK-293 para generar diacuerpo Hu2B6 4.5 y Hu3G8 5.1. Después de tres días en cultivo, el medio acondicionado se recogió y se caracterizó por ELISA de unión. El resultado de este experimento se representa en la figura 36.

20 *Diseño experimental:* Se recubrieron 100 ng/pocillo de FcRIIb-G2-agluc soluble en placa Maxisorp de 96 pocillos en tampón carbonato a 40 °C durante una noche. La placa se lavó tres veces con PBS/Tween 20 al 0,1 % y después se bloqueó mediante BSA al 0,5 % en PBS/Tween 20 al 0,1 % durante 30 min a temperatura ambiente antes de añadir diacuerpos. Se añadió una serie de dilución de factor dos de medio acondicionado de diacuerpo biespecífico Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1, diacuerpo Hu2B6 4.5 y diacuerpo hu3G8 5.1 empezando desde 25 ng/pocillo a cada pocillo. La
25 la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS/Tween 20 al 0,1 % tres veces, se añadieron 10 ng/pocillo de FcRIIIa-G2-Biotina a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS/Tween 20 al 0,1 % tres veces, se usaron 50 ul de dilución 1:5000 de HRP conjugada con estreptavidina (Amersham Pharmacia Biotech) para la detección. Después de 45 minutos de incubación a temperatura ambiente, la placa se lavó con PBS/Tween 20 al 0,1 % tres veces y se reveló usando
30 sustrato TMB. Después de 10 minutos de incubación, la reacción se detuvo mediante H2SO4 al 1 %. La DO 450 nm se leyó mediante el programa SOFTmax. La lectura se representó usando el programa informático GraphPadPrism 3.03.

6.13 Construcción de diacuerpos IgDART

35 Se construyeron diacuerpos IgDART que contienen regiones variables que pueden unirse a CD32 y complejo receptor de linfocitos B ("BCRC"). El primer diacuerpo empleó un conector LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267) entre las secuencias VH y las secuencias Fc de la molécula. El segundo diacuerpo empleó un conector LEIK que tiene la secuencia: LEIK (SEQ ID NO: 268) o un conector TVSS que tiene la secuencia TVSS (SEQ ID NO: 269). Las secuencias de las cadenas de estos diacuerpos y polinucleótidos codificantes se muestran a continuación:

H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa

(SEQ ID NO: 270):

DIQMTQSPSS	LSASVGDVRT	ITCRASQEIS	GYLSWLQQKP	GKAPRRLIYA	50
ASTLDSGVPS	RFSGSESGTE	FTLTISLQ	EDFATYYCLQ	YFSYPLTFGG	100
GTKVEIK	<u>GGG</u>	<u>SGGG</u>	QVQLV	QSGAEVKKPG	150
ASVKV	SCKAS	GYTFTSYWMN			200
WVRQAPGQGL	EWIGMIDPSD	SETHYNQKFK	DRVTMTDTS	TSTAYMELRS	250
LRSDDTAVYY	CARAMGYWGQ	GTTVTVSS	<u>LG</u>	<u>GCGGGS</u>	300
RTVA	APSVFIFPPS				343
DEQLKSGTAS	VVCLLNNFYP	REAKVQWKVD	NALQSGNSQE	SVTEQDSKDS	
TYSLSSTLTL	SKADYEKKHV	YACEVTHQGL	SSPVTKSFNR	GEC	

Las secuencias H8B5VL se fusionan a las secuencias hBCRCVH mediante el conector GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) ubicado en la posición 108-115. Las secuencias hBCRCVH se fusionan a las secuencias Fc mediante el conector LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267) ubicado en la posición 229-236 (ambas mostradas subrayadas anteriormente). El polinucleótido que codifica la secuencia H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa es:

(SEQ ID NO: 271):

gacatccaga	tgaccacgtc	tccatcctcc	ttatctgcct	ctgtgggaga	50
tagagtccacc	atcacttgtc	gggcaagtca	ggaaattagt	ggttacttaa	100
gctggctgca	gcagaaacca	ggcaaggccc	ctagacgcct	gatctacgcc	150
gcatccactt	tagattctgg	tgtcccatcc	aggttcagt	gcagtgagtc	200
tgggaccgag	ttcaccctca	ccatcagcag	ccttcagcct	gaagattttg	250
caacctatta	ctgtctacaa	tatttttagtt	atccgctcac	gttcggagg	300
gggaccaagg	tggaaataaa	<u>aggaggcgga</u>	<u>tccggaggcg</u>	<u>gagggcaggt</u>	350
tcagctgggtg	cagctctggag	ctgaggtgaa	gaagcctggc	gcctcagtga	400
aggtctcctg	caaggcttct	ggttacacct	ttaccagcta	ctggatgaac	450
tgggtgcgac	aggcccttg	acaaggcctt	gagtggatcg	gaatgattga	500
tccttcagac	agtgaactc	actacaatca	aaagttcaag	gacagagtca	550
ccatgaccac	agacacatcc	acgagcacag	cctacatgga	gctgaggagc	600
ctgagatctg	acgacacggc	cgtgtattac	tgtgcgagag	ctatgggcta	650
ctgggggcaa	gggaccacgg	tcaccgtctc	ctc <u>actggga</u>	<u>ggctgcggcg</u>	700
<u>gagggagcgcg</u>	aactgtggct	gcaccatcgg	tcttcatctt	cccgccatct	750
gatgagcagt	tgaatcttg	aactgcctct	gttgtgtgcc	tgtgaataa	800
cttctatccc	agagaggcca	aagtacagt	gaaggtggat	aacgccctcc	850
aatcgggtaa	ctcccaggag	agtgtcacag	agcaggacag	caaggacagc	900
acctacagcc	tcagcagcac	cctgacgctg	agcaaagcag	actacgagaa	1000
acacaaagtc	tacgcctgcg	aagtcaccca	tcagggcctg	agctcgcccg	1050
tcacaaagag	cttcaacag	ggagagtgtt	ag		1082

donde las secuencias que codifican los conectores: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) y LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267) están ubicadas en la posición 322-345 y 685-708, respectivamente (ambas mostradas subrayadas anteriormente).

10 HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hGI

(SEQ ID NO: 272):

DVVMTQSPLS	LPVTLGQPAS	ISCKSSQSL	DSDGKTYLNW	FQQRPGQSPN	50
RLIYLVSKLD	SGVPDRFSGS	SGGTDFTLKI	SRVEAEDVGV	YYCWQGTTHFP	100
LTFGGGTKLE	<u>IKGGGSGGGG</u>	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	150
DAWMDWVRQA	PGGLEWVAE	IRNKAKNHAT	YYAESVIGRF	TISRDDAKNS	200
LYLQMNLSLRA	EDTAVYYCGA	LGLDYWGQGT	LVTVSS	<u>LGGC</u>	250
SVFPLAPSSK	TSGGTAALG	CLVKDYFPEP	VTVSWNSGAL	TSGVHTFPAV	300
LQSSGLYSL	SVVTPSSSL	GTQTYICNVN	HKPSNTKVDK	RVEPKSCDKT	350
HTCPFCPAPE	LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	400
KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	450
SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	SRDELTKNQV	SLTCLVKGFY	500
PSDIAVEWES	NGQFENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD	KSRWQQGNVF	550
SCSVMHLEALH	NHYTQKLSL	SPGK			574

Las secuencias hBCRCVL se fusionan a las secuencias H8B5VH mediante el conector GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) ubicado en la posición 113-120. Las secuencias H8B5VH se fusionan a las secuencias Fc mediante el conector LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267) ubicado en la posición 237-244 (ambas mostradas subrayadas anteriormente). El polinucleótido que codifica la secuencia HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hGI es:

(SEQ ID NO: 273):

gatgttgtga	tgaactcagtc	tcactctctcc	ctgcccgtca	cccttgagaca	50
gccggcctcc	atctcctgca	agtcaagtc	gagcctctta	gatagtgatg	100
gaaagacata	tttgaattgg	tttcagcaga	ggccaggcca	atctccaaac	150
cgcctaattt	atctgggtgtc	taaaactggac	tctgggggtcc	cagacagatt	200
cagcggcag	gggtcaggca	ctgatttcac	actgaaaatc	agcagggtgg	250
aggctgagga	tgttgggggt	tattactgct	ggcaagggtac	acattttccg	300
ctcacgttcg	gcggaggggac	caagcttgag	atcaaaggag	<u>gcggtatccgg</u>	350
<u>aggcggaggc</u>	gaagtgcagc	ttgtggagtc	tggaggaggc	ttggtgcaac	400
ctggaggatc	cctgagactc	tcttgtgccg	cctctggatt	cacttttagt	450
gacgcctgga	tggactgggt	ccgtcaggcc	ccaggcaagg	ggcttgagtg	500
ggtttctgaa	attagaaaca	aagctaaaaa	tcatgcaaca	tactatgctg	550
agtctgtgat	agggaggttc	accatctcaa	gagatgacgc	caaaaacagt	600
ctgtacctgc	aaatgaacag	cttaagagct	gaagacactg	ccgtgtatta	650
ctgtggggct	ctgggccttg	actactggg	ccaaggcacc	ctggtgaccg	700
tctccagcct	<u>gggaggctgc</u>	<u>ggcggaggga</u>	<u>gcgcctccac</u>	caagggccca	750
tccgtcttcc	ccttggcacc	ctcctccaag	agcaccctctg	ggggcacagc	800
ggccttgggc	tgccctgtca	aggactactt	ccccgaaccg	gtgacggtgt	850
cgtggaactc	aggcgccttg	accagcggcg	tgcaacactt	cccggtgttc	900
ctacagtcct	caggactcta	ctccctcagc	agcgtgggtga	ccgtgccctc	950
cagcagcttg	ggcaccacaga	cctacatctg	caacgtgaat	cacaagccca	1000
gcaacaccaa	ggtggacaag	agagttgagc	ccaaatcttg	tgacaaaact	1050
cacacatgcc	caccgtgccc	agcacctgaa	ctcctggggg	gaccgtcagt	1100
cttctctctc	ccccaaaaac	ccaaggacac	cctcatgatc	tcccggacce	1150
ctgaggtcac	atgcgtgggtg	gtggacgtga	gccacgaaga	ccctgaggtc	1200
aagttcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	gtgcataatg	ccaagacaaa	1250
gccgcgggag	gagcagtaga	acagcacgta	ccgtgtgggtc	agcgtcctca	1300
ccgtcctgca	ccaggactgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaagggtc	1350
tccaacaaa	ccctcccagc	ccccatcgag	aaaaccatct	ccaaagccaa	1400
agggcagccc	cgagaaccac	aggtgtacac	cctgccccca	tcccgggatg	1450
agctgaccaa	gaaccagggtc	agcctgacct	gcctgggtcaa	aggcttctat	1500
cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggagagc	aatgggcagc	cggagaacaa	1550
ctacaagacc	acgcctccccg	tgctggactc	cgacggctcc	ttcttccctc	1600
acagcaagct	caccgtggac	aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	1650
tcattgctccg	tgatgcattga	ggctctgcac	aaccactaca	cgcagaagag	1700
cctctccctg	tctccgggta	aa			1722

donde las secuencias que codifican los conectores: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) y LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267) están ubicadas en la posición 337-360 y 709-732, respectivamente (ambas mostradas subrayadas anteriormente).

5 H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K₍₋₄₎LEIK_{hKappa}

(SEQ ID NO: 274):

DIQMTQSPSS	LSASVGDRT	ITCRASQEIS	GYLSWLQQKP	GKAPRRLIYA	50
ASTLD SGVPS	RFGSGESGTE	FTLTISSLQP	EDFATYYCLQ	YFSYPLTFGG	100
GTKVEIKGGG	<u>SGGGGQVQLV</u>	QSGAEVKKPG	ASVKVSCAS	GYTFTSYWMN	150
WVRQAPGQGL	EWIGMIDPSD	SETHYNQKFK	DRVTMTDTS	TSTAYMELRS	200
LRSDDTAVYY	CARAMGYWGQ	GTTVLEIKRT	VAAPSVFIFP	PSDEQLKSGT	250
ASVVCLLNMF	YPREAKVQWK	VDNALQSGNS	QESVTEQDSK	DSTYLSSTL	300
TLKADYKHK	KVYACEVTHQ	GLSSPVTKSF	NRGEC		335

Las secuencias H8B5VL se fusionan a las secuencias HBCRCVH mediante el conector GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) ubicado en la posición 108-115. Las secuencias HBCRCVH se fusionan a las secuencias Fc mediante el conector LEIK (SEQ ID NO: 268) ubicado en la posición 225-228 (ambas mostradas subrayadas anteriormente). El polinucleótido que codifica la secuencia H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K₍₋₄₎LEIK_{hKappa} es:

10

(SEQ ID NO: 275):

gacatccaga	tgacccagtc	tccatccctcc	ttatctgcct	ctgtgggaga	50
tagagtcacc	atcacttgtc	gggcaagtc	ggaattag	ggttacttaa	100
gctggctgca	gcagaaacca	ggcaaggccc	ctagacgcct	gatctacgcc	150
gcatccactt	tagattctgg	tgtcccatcc	aggttcagtg	gcagtgaagtc	200
tgggaccgag	ttcaccctca	ccatcagcag	ccttcagcct	gaagattttg	250
caacctatta	ctgtctacaa	tatttttagtt	atccgctcac	gttcggagggg	300
gggaccaagg	tggaaataaa	<u>aggagggcga</u>	<u>tccggaggcg</u>	<u>gagggc</u> aggt	350
tcagctgggtg	cagtctggag	ctgaggtgaa	gaagcctggc	gcctcagtga	400
aggtctcctg	caaggcttct	ggttacacct	ttaccagcta	ctggatgaac	450
tgggtgcgac	aggcccctgg	acaaggcctt	gagtggatcg	gaatgattga	500
tccttcagac	agtgaactc	actacaatca	aaagttcaag	gacagagtca	550
ccatgaccac	agacacatcc	acgagcacag	cctacatgga	gctgaggagc	600
ctgagatctg	acgacacggc	cgtgtattac	tgtgcgagag	ctatgggcta	650
ctggggggcaa	gggaccacgg	<u>tcctggagat</u>	<u>caagcgaact</u>	gtggctgcac	700
catcgggtctt	catcttcccg	ccatctgatg	agcagttgaa	atctggaact	750
gcctctgttg	tgtgcctgct	gaataacttc	tatcccagag	aggccaaagt	800
acagtgggaag	gtggataacg	ccctccaatc	gggtaactcc	caggagagtg	850
tcacagagca	ggacagcaag	gacagcacct	acagcctcag	cagcacccctg	900
acgctgagca	aagcagacta	cgagaaacac	aaagtctacg	cctgcgaagt	950
caccatcag	ggcctgagct	cgcccgtcac	aaagagcttc	aacaggggag	1000
agtgt					1005

donde las secuencias que codifican los conectores: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) y LEIK (SEQ ID NO: 268) están ubicadas en la posición 322-345 y 673-684, respectivamente (ambas mostradas subrayadas anteriormente).

HBCRCVL R45N-h8B5VH₍₋₄₎TVSS-hG1 = HBCRCVL R45N-h8B5VH₍₋₄₎hG1

(SEQ ID NO: 276):

DVVMTQSPLS	LPVTLGQPAS	ISCKSSQSLL	DSDGKTYLNW	FQQRPGQSPN	50
RLIYLVSKLD	SGVPDRFSGS	SGGTDFTLKI	SRVEAEDVGV	YYCWQGTTHFP	100
LTFGGGTKLE	<u>IKGGGSGGGG</u>	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	150
DAWMDWVRQA	PGGLEWVAE	IRNKAHNHAT	YYAESVIGRF	TISRDDAKNS	200
LYLQMNSLRA	EDTAVYYCGA	LGLDYWGQGT	LV <u>TVSS</u> ASTK	GPSVFPLAPS	250
SKSTSGGTAA	LGCLVKDYFP	EPVTVSWNSG	ALTSGVHTFP	AVLQSSGLYS	300
LSSVVTVPSS	SLGTQTYICN	VNHPKPSNTKV	DKRVEPKSCD	KTHTCPPCPA	350
PELLGGPSVF	LFPPKPKDNL	MISRTPEVTC	VVVDVSHEDP	EVKFNWYVDG	400
VEVHNAKTKP	REEQYNSTYR	VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKALPAP	450
IEKTISKAKG	QPREPQVYTL	PFSRDELTKN	QVSLTCLVKG	FYPDSIAVEW	500
ESNGQPENNY	KTPPVLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	VFSCSVMHEA	550
LHNHYTQKSL	SLSPGK				566

Las secuencias HBCRCVL se fusionan a las secuencias h8B5VH mediante el conector GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) ubicado en la posición 113-120. Las secuencias h8B5VH se fusionan a las secuencias Fc mediante el conector TVSS (SEQ ID NO: 269) ubicado en la posición 233-236 (ambas mostradas subrayadas anteriormente). El polinucleótido que codifica HBCRCVL R45N-h8B5VH₍₋₄₎TVSS-hG1 es:

(SEQ ID NO: 277):

```

gatgttgtga tgaactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca      50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg      100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac      150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctgggggtcc cagacagatt      200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcaggggtg      250
aggctgagga tgttgggggt tattactgct ggcaagggtac acattttccg      300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaaggag gcggatccgg      350
aggcggagggc gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac      400
ctggaggatc cctgagactc tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt      450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc ccaggcaagg ggcttgagtg      500
ggttgtctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg      550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt      600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg cagtgtatta      650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg      700
tctccagcgc ctccaccaag ggcccacggc tcttccccct ggccacctcc      750
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggccaagga      800
ctactcccc gaaccgggtg cgggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca      850
gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc      900
ctcagcagcg tggtagccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctc      950
catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag      1000
ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgoccagca      1050
cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa      1100
ggacaccctc atgatctccc ggacccttga ggtcacatgc gtggtggtgg      1150
acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc      1200
gtggagggtg ataatgcca gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag      1250
cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga      1300
atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc      1350
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt      1400
gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc      1450
tgacctgcct ggtaaaaggc ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg      1500
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct      1550
ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga      1600
gcagggtgca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct      1650
ctgcacaacc actacaagca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa      1698

```

donde las secuencias que codifican los conectores: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) y TVSS (SEQ ID NO: 269) están ubicadas en la posición 337-360 y 697-708, respectivamente (ambas mostradas subrayadas anteriormente).

6.14 Optimización de conectores

- 5 Como se analiza anteriormente, los diacuerpos IgDART de la presente divulgación contienen preferiblemente conectores entre las secuencias VH y las secuencias Fc de la molécula. Se realizaron experimentos para optimizar los conectores para maximizar el rendimiento y la actividad. Se emplearon los siguientes conectores.

SEQ ID NO:	Conector
278	FNRGECGGGS
279	FNRGECLQVYYRM
280	LEGEEG
281	LEGEEGC
282	LEIK
283	LGEEG
284	LGEEGC
285	LGGCGGGS
286	LGKKG
287	LGKKGC

ES 2 733 067 T3

288	LKGKKG
289	LKGKKGC
290	LQVYYRM
291	LQVYYRMC
292	TVSS
293	VEPKSCGGGS
294	VEPKSCYLYLRARV
295	VQVHYRM
296	VQVHYRMC
297	YLYLRARV
298	YLYLRARVC

Los conectores anteriores se introdujeron en plásmidos para generar un conjunto de diacuerpos IgDART que tienen diferentes combinaciones de conectores:

Plásmido pMGX	Conector de cadena A SEQ ID NO:	pEE13.4	Conector de cadena B SEQ ID NO:	pEE6.4	ELISA (µg/ml)	Proteína purificada (después de SEC) (1 litro)
900	285	√	285	√	0,799	0,3 mg
901	283	√	286	√	0,628	0,4 mg
902	284	√	287	√	0,896	0,47 mg
903	280	√	288	√	0,557	
904	281	√	289	√	0,450	0,4 mg
905	293	√	278	√	0,360	
906	294	√	279	√	N/A	
907	282	√	292	√	N/A	
908	297	√	295	√	0,428	0,2 mg
909	297	√	290	√	0,305	0,3 mg
910	298	√	296	√	N/A	
911	298	√	291	√	0,218	

- 5 Se determinaron las propiedades de agregación de los IgDART producidos.

Conectores de IgDART	Proteína total (mg)	% de oligómero	% de monómero	% de fragmento	Orden SB
900A/900B	0,51	12	45	43	4
901A/901B	0,72	5	83	12	1
902A/902B	0,78	21	48	31	4

903A/903B	0,5	3	84	13	1
904A/904B	0,66	16	65	26	4
905A/905B	0,5	20	60	20	3
908A/908B	0,5	13	65	17	2
908A/909B	0,38	22	50	28	3
910A/911B	0,2	45	10	45	5

Los datos mostraron inesperadamente que las construcciones que tienen conectores, tales como los empleados en 901A/901B; 903A/903B; y 908A/908B daban resultados drásticamente superiores (menos oligomerización y/o menos producción de fragmento) que las construcciones que tienen conectores, tales como 910A/911B.

5 6.15 DART con enrollamiento-E/enrollamiento-K

Como se apreciará en vista de los anterior, los polipéptidos individuales de un DART biespecífico pueden formar dos especies de homodímeros y una especie de heterodímero. En una realización de la presente divulgación, puede añadirse un polipéptido cargado al extremo C de uno, o más preferiblemente, ambos polipéptidos DART. Seleccionando polipéptidos cargados de carga opuesta para los polipéptidos individuales del DART biespecífico, la inclusión de dichos polipéptidos cargados favorece la formación de heterodímeros y reduce la formación de homodímeros. Preferiblemente, un polipéptido cargado positivamente contendrá un contenido sustancial de arginina, glutamina, histidina y/o lisina (o mezclas de dichos aminoácidos) y un polipéptido cargado negativamente contendrá un contenido sustancial de aspartato o glutamato (o una mezcla de dichos aminoácidos). Los polipéptidos cargados positivamente que contienen un contenido sustancial de lisina y polipéptidos cargados negativamente que contienen un contenido sustancial de glutamato son particularmente preferidos. Para maximizar la atracción electrostática entre dichos polipéptidos cargados opuestamente, se prefiere emplear polipéptidos que puedan asumir espontáneamente una conformación helicoidal.

Por tanto, en una realización preferida, se anexará un "enrollamiento-E" cargado positivamente a uno de los polipéptidos que se están usando para formar un DART biespecífico y se anexará un "enrollamiento-K" cargado negativamente al segundo de los polipéptidos de DART (figura 37).

Un enrollamiento-E particularmente preferido tendrá la secuencia: (EVAALEK)₄:

SEQ ID NO: 299 EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

Un enrollamiento-K particularmente preferido tendrá la secuencia: (KVAALKE)₄:

SEQ ID NO: 300 KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Un polipéptido de DART preferido que posea dicho enrollamiento-E tendrá la secuencia general: [dominio VL]-[GGGSGGGG]-[dominio VH]-[(EVAALEK)₄]-GGGNS, donde VL es el dominio de Ig ligero variable de DART, GGGSGGGG es la SEQ ID NO: 10, VH es el dominio de Ig pesado variable de DART, (EVAALEK)₄ es la SEQ ID NO: 299, y GGGNS es la SEQ ID NO: 301. Un polipéptido de DART preferido que posea dicho enrollamiento-K tendrá la secuencia general: [dominio VL]-[GGGSGGGG]-[dominio VH]-[(KVAALKE)₄]-GGGNS, donde VL es el dominio Ig ligero variable de DART, GGGSGGGG es la SEQ ID NO: 10, VH es el dominio de Ig pesado variable de DART, (KVAALKE)₄ es la SEQ ID NO: 300, y GGGNS es la SEQ ID NO: 301.

6.16 DART que contienen Fc con enrollamiento-E/enrollamiento-K

En una realización adicional, las regiones Fc pueden ligarse a los enrollamientos-E y/o K de los DART con enrollamiento-E o enrollamiento-K.

Además, la separación entre las regiones Fc y el dominio VH de DART de un DART que contiene Fc es deseable en casos en que una disposición menos separada de dichos dominios provoca una interacción disminuida entre dichos dominios y sus ligandos de unión o interfiere de otro modo con el ensamblaje de DART. Aunque pueden emplearse separadores de cualquier secuencia de aminoácidos, es preferible emplear separadores que formen enrollamientos de hélice α , para prolongar y proyectar al máximo el dominio Fc desde los dominios variables (figura 37). Como los polipéptidos enrollados descritos anteriormente de carga opuesta funcionan adicionalmente promoviendo la formación de heterodímeros, dichas moléculas son separadores particularmente preferidos. Dichas moléculas de Fc-DART que contienen enrollamiento proporcionan beneficios similares a los de Fc-DART, incluyendo semivida en suero mejorada y reclutamiento de función efectora. Los polipéptidos con enrollamiento-E y enrollamiento-K descritos anteriormente son particularmente preferidos para este fin.

Por tanto, en una realización preferida, el DART que contiene Fc con enrollamiento-E tendrá la secuencia general: [dominio VL]-[GGGSGGGG]-[dominio VH]-[(EVAALEK)₄]-GGG-dominio Fc partiendo de D234 (numeración de Kabat), donde VL es el dominio de Ig ligero variable de DART, GGGSGGGG es la SEQ ID NO: 10, VH es el dominio de Ig pesado variable de DART y (EVAALEK)₄ es la SEQ ID NO: 299.

- 5 Asimismo, en una realización preferida, el DART que contiene Fc con enrollamiento-K tendrá la secuencia general: [dominio VL]-[GGGSGGGG]-[dominio VH]-[(KVAALKE)₄]-GGG-dominio Fc partiendo de D234 (numeración de Kabat), donde VL es el dominio de Ig ligero variable de DART, GGGSGGGG es la SEQ ID NO: 10, VH es el dominio de Ig pesado variable de DART y (KVAALKE)₄ es la SEQ ID NO: 300.

- 10 Como se indica anteriormente, una molécula de DART que contiene enrollamiento o una molécula de DART que contiene Fc que contiene enrollamiento puede contener únicamente un solo separador de dicho enrollamiento, o puede contener más de uno de dichos separadores (por ejemplo, dos separadores, preferiblemente de carga opuesta, de los que uno se liga a cada uno del dominio VH de los polipéptidos de DART). Ligando la región Fc a dicha o dichas moléculas separadoras, se potencia la capacidad de generar versiones bivalentes, tetravalentes, etc. de las moléculas de Fc-DART por intercambio de cadenas (figura 39). Como se muestra en la figura 39, pueden producirse moléculas de Fc-DART que formen monómeros o dímeros dependiendo de si el dominio Fc está ligado a uno o ambos dominios VH de DART.

6.17 Actividad funcional de DART que contienen Fc con enrollamiento-E/enrollamiento-K

- 20 Se produjeron especies de Fc-DART con enrollamiento-E y/o enrollamiento-K a partir de moléculas de DART biespecíficas que tienen: (1) las regiones ligera y pesada variables del anticuerpo reactivo al (complejo BCR) CD79b, CB3 y (2) las regiones ligera y pesada variables de una variante de baja afinidad (denominada variante "YA") del anticuerpo reactivo a CD32B, 2B6. Esta región variable de cadena ligera de este anticuerpo difiere de la del anticuerpo 2B6 en que contiene mutaciones: N50Y y V51A. Por tanto, el anticuerpo YA2B6 tiene la secuencia de región variable de cadena ligera:

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRTSQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASE
SISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNTWPFYFGGGTKVEI
K (SEQ ID NO: 302).

- 25 La secuencia de la región variable de cadena pesada de este anticuerpo es:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGGGLEWMGVDP
SDTYPNYNKKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARNGDSYYSS
GMDYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 303); o

El anticuerpo de baja afinidad se seleccionó ya que se unirá preferentemente a CD32B en *cis* en células que expresan CD79b (linfocitos B). Por tanto, la configuración disminuirá la interacción con otras células que expresan CD32B (monocitos, células endoteliales, hígado), así como la interacción en *trans* indeseable.

- 30 Se prepararon derivados con enrollamiento-E y/o enrollamiento-K y los derivados que contienen Fc con enrollamiento-E y/o enrollamiento-K de dichos DART h2B6YAhCB3. Se usó cromatografía de exclusión molecular para analizar el tamaño aproximado y la heterogeneidad de las moléculas producidas. Como se muestra en la figura 40, se formaron dímeros a partir de DART con enrollamiento-E/enrollamiento-K que tienen una sola región Fc unida ligada a un dominio de enrollamiento-K, así como DART con enrollamiento-E/enrollamiento-K que tienen una sola región Fc unida ligada a un dominio de enrollamiento-E. El monómero deseado, así como las moléculas dimericas se recuperaron de preparaciones en que las regiones Fc estaban ligadas a los dos enrollamientos, E y K, de la misma molécula de DART, siendo el monómero el producto mayoritario formado. La figura 41 muestra la posible estructura de las moléculas dimericas producidas.

- 40 Las fracciones de cromatografía de exclusión molecular se analizaron usando electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida para analizar adicionalmente las estructuras de las moléculas producidas (figura 42). Los derivados de DART con enrollamiento-E/enrollamiento-K (sin región Fc) migraban como dos bandas predominantes cada una de aproximadamente 28 kD (correspondiente al polipéptido que contiene KFc y al polipéptido que contiene EFc ligeramente más pequeño) y una banda menos prominente a aproximadamente 49 kD (correspondiente al DART de enrollamiento-E/enrollamiento-K). Las fracciones monoméricas de los derivados de DART que contienen Fc con enrollamiento-E/enrollamiento-K (EFc/K o E/KFc) de la cromatografía de exclusión molecular mostraron únicamente la banda de peso molecular más grande o más pequeño a aproximadamente 28 kD (correspondiente a si el DART era el DART que contiene KFc (banda de peso molecular más grande) o el DART que contiene EFc (banda de peso molecular más pequeño). El material migraba predominantemente a aproximadamente 49 kD (correspondiente al DART de enrollamiento-E/enrollamiento-K). También se observaron bandas de peso molecular mayor significativas.

- 50 Se realizó un ELISA de unión biespecífico para caracterizar las moléculas producidas. CD79 se depositaron en una placa de ELISA. Los DART entonces se unieron a la placa. La unión del DART se detectó usando sCD32B-biotina

seguido de incubación con estreptavidina-HRP. Como se muestra en la figura 43, los derivados de DART h2B6YAhCB3 que contienen Fc con enrollamiento-E/enrollamiento-K (EFc/K o E/KFc) mostraron potenciación significativa de la unión con respecto a un DART h2B6YAhCB3, o a un derivado de DART EFc/KFc h2B6YAhCB3.

El entrecruzamiento de anticuerpos que se han unido a CD79b da lugar a la activación de linfocitos B (Van Kooten, C. et al. (1997) "Cross-Linking Of Antigen Receptor Via Ig-B (B29, CD79b) Can Induce Both Positive And Negative Signals In CD40-Activated Human B Cells," Clin. Exp. Immunol. 110:509-515). Como las moléculas de DART h2B6YAhCB3 pueden unirse a ambos receptores inhibidores CD79b y CD32B, tienen la capacidad de "reclutar" CD32B a sitios de unión a CD79b, y bloquear de ese modo la proliferación de linfocitos B. Para demostrar esta capacidad, los DART se incubaron con linfocitos B que se habían expuesto a anticuerpos que pueden unirse entrecruzadamente con anticuerpos anti-CD79b. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 44. Los resultados muestran que anticuerpos dirigidos únicamente contra CD79b o CD32B (Ch2B6N297Q y ChCB3.1N297Q, respectivamente) no lograban inhibir la proliferación de linfocitos B. Los derivados de DART EFc/KFc h2B6YA x hCB3 eran sustancialmente más eficaces en la inhibición de la proliferación de linfocitos B, como el propio DART h2B6YA x hCB3 y el control h2B6YA x hCB3 VF. Se descubrió que los DART con enrollamiento-E/enrollamiento-K que tienen únicamente una sola región Fc ligada (derivados de DART E/KFc h2B6YA x hCB3 y derivados de DART EFc/K h2B6YA x hCB3) ejercen la máxima inhibición sobre la proliferación de linfocitos B.

6.18 Modificaciones de DART para alterar la semivida en suero *in vivo*

Como se analiza anteriormente, las moléculas de anticuerpo recombinantes pequeñas tales como moléculas monocatenarias biespecíficas (por ejemplo, que tienen una masa molecular de aproximadamente 55 kDa) se eliminan rápidamente de la circulación. Estudios farmacocinéticos *in vivo* de moléculas de DART en ratones mostraron la semivida a corto plazo esperada de aproximadamente 2 horas.

En algunas realizaciones, tal como en el tratamiento de una afección inflamatoria aguda, se desea dicha semivida corta, sin embargo, en otras realizaciones tal como en el tratamiento de cáncer y enfermedades y afecciones crónicas, se prefiere que las moléculas de DART de la presente divulgación muestran semividas más largas.

Para mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de las moléculas de DART para dichos usos, las moléculas de DART pueden modificarse para que contengan una parte polipeptídica de una proteína de unión a suero en uno o más de los extremos de la molécula de DART. Mucho más preferiblemente, dicha parte polipeptídica de una proteína de unión a suero se instalará en el extremo C de la molécula de DART. Una parte polipeptídica particularmente preferida de una proteína de unión a suero para este fin es el dominio de unión a albúmina (ABD) de la proteína G de estreptococos. El dominio 3 de unión a albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de *Streptococcus* cepa G148 es particularmente preferido.

El dominio 3 de unión a albúmina (ABD3) de la proteína G de *Streptococcus* cepa G148 consiste en 46 restos de aminoácido que forman un grupo de tres hélices estable y tiene amplia especificidad de unión a albúmina (Johansson, M.U. et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). La albúmina es la proteína más abundante en plasma y tiene una semivida de 19 días en seres humanos. La albúmina posee varios sitios de unión de molécula pequeña que le permiten unirse no covalentemente a otras proteínas y de ese modo prolongar sus semividas en suero.

Para demostrar la capacidad de una parte polipeptídica de una seroproteína de prolongar la semivida de un DART, se fusionó el dominio ABD3 de la proteína G de estreptococos con un DART biespecífico recombinante (inmunorreactivo con los antígenos hCD16 y hCD32B) para generar una molécula de anticuerpo recombinante, ABD-DART hCD16-hCD32B (figura 45). Este ABD-DART mostró unión específica a ambos antígenos, así como con seroalbúmina humana (HSA) y pudo redirigir las células efectoras *in vitro*. En comparación con el DART de control, este ABD-DART mostró un fuerte aumento de la semivida en suero en ratones. Esta estrategia puede usarse como ruta viable para aumentar la semivida de agentes farmacéuticos potencialmente importantes como DART hasta más de 90 minutos, más de 2 horas, más de 5 horas, más de 10 horas, más de 20 horas y mucho más preferiblemente, más de 30 horas.

Materiales y métodos:

Diseño y construcción de ABD DART: El ABD DART hCD16-hCD32B se preparó usando como cadena 1:

hCD16VL-G3SG4-hCD32BVH-enrollamiento-K [(KVAALKE)₄] donde CD16VL indica el CD16VL de 3G8, G3SG4 indica la SEQ ID NO: 10, hCD32BVH indica el CD32BVH de 2B6 y (KVAALKE)₄ indica la SEQ ID NO: 300;

y como cadena 2:

hCD32BVL-G3SG4-hCD16VH-GGCGGG-enrollamiento-E [(EVAALEK)₄]-GGGNS-ABD

donde CD32BVL indica CD32BVL, G3SG4 indica la SEQ ID NO: 10, hCD16VH indica CD16VH, GGCGGG es los restos 2-7 de la SEQ ID NO: 267, enrollamiento-E [(EVAALEK)₄] es la SEQ ID NO: 299, GGGNS es la SEQ ID NO: 301 y ABD es:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLINNAKT VEGVKALID EILALP (SEQ ID NO: 304)

- 5 Por consiguiente, la secuencia de la cadena 1 (h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-enrollamientoK-GGGNS) es:

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVDFDGDSEFMNWWY QQKPGQPPKL
LIYTTSNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLITS SLQAEDVAVY YCQSNEDPY
TFGQOTKLEI KGGCGSGGGGQ VQLVQSCAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YWIHWVRQAP GQGLEWIGVI DPSDTYPNIN KKFKGRVTMT VVVSTSTAYM
ELRSLRSDDT AVYYCARNGD SDYYSGMDYW GQGTITVTVSS GCGGGGKVAA
LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKEGGGNS (SEQ ID NO: 305)

Un polinucleótido preferido que codifica la cadena 1 (h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-enrollamientoK-GGGNS) es:

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggtgtgt ctctagggga gagggccacc
atcaactgca aggccagcca aagtggtgat ttgatggtg atagttttat gaactggtac
caacagaaac caggacagcc aocaaaactc ctcatctata ctacatecaa tctagaatct
gggttcccag acaagtttag tggcagtggt totgggacag acttcacct caccatcagc
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaataa agatccgtac
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggcg cggaggccag
gttcagctgg tgcagttctg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc
tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgctg acaggccctc
ggacaagggc ttgagtggat tggagtgtat gatccttctg atacttatcc aaattacaat
aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtctgtat ccacgagcac agcctacatg
gagctgagga gccagagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcag aaacggtgat
tcgallatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctcc
ggaggtatgt gccgtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgtctg tttgaaagag
aaggtcgcgc cacttaagga aaaggtcgca gccctgaaag agggcgccgc gaattct
(SEQ ID NO: 306)

Por consiguiente, la secuencia de la cadena 2 (h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-enrollamientoE-GGGNS-ABD) es:

VGWIRQFPGK ALEWLAHIW DDKRYNPAL KSRLTISKOT SKNQVVLMT
NMDFVDTATY YCAQINPAWF AYWGQGTIVT VSSGCGGGGE VAALEKEVAA
LEKEVAALEK EVAALEKGGG NSLAEAKVLA NRELDKYGVS DYYKNLINNA
10 KTVEGVKALI DEILALP (SEQ ID NO: 307)

Un polinucleótido preferido que codifica la cadena 2 (h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-enrollamientoE-GGGNS-ABD) es:

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc
ttcacctgca ggaccagtc gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca
gatcagcttc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg
aggttcagtg ccagtgatc tgggacagat ttcaacctca catcaatag cctggaaagct
gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaataact ggcggttcac gttcggggga
gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcgccg gaggcacagt taccctgaga
gagtctggcc ctgcctggtg gaagccaca cagacccctc cactgaattg taactctctc
gggtttttcac tgagcaattc tgggtatggt gtaggctgga ttctgcagcc tccggggaag
gctctagagt ggcctggcaca catttggttg gatgatgaca agcctataa tccagccctg
aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc
aacatggacc ctgtggatac tgcacatac tactgtgctc aaataaaacc cgcctgggtt
gettactggg gccaagggac tctggctact gtgagctccg gaggatgttg cgtggagaa
gtggccgcac tggagaaaga ggttctgtct ttggagaagg aggtcctctg acttgaaaag
gaggtcgcag cctggagaa agggcgccgg aattctcttg ccgaagcaaa agtctggtcc
aacgcgcgac tggataaata tggcgtgagc gattattata agaactgat taacaaagca
aagacgttg aaggcgtgaa agcactgatt gatgaaatto tggcgcctct gact
(SEQ ID NO: 308)

Cada segmento VL y VH se amplificó por PCR usando DART hCD16-hCD32B como molde. Para la cadena 2, las secuencias de nucleótidos que contienen enrollamiento-E y ABD se formaron dimerizando el cebador y después se subclonaron en el extremo C de la región VH de hCD16 usando digestión de restricción y ligamiento. Ambas cadenas se clonaron en el vector pCneo (Promega, inc.) en los sitios NheI-NotI. Los plásmidos individuales que albergaban la cadena 1 respectiva digerida en NgoMIV-NheI y los casetes de expresión de la cadena 2 digeridos en

BstBI-PmeI entonces se clonaron en un único plásmido para la transfección en células CHO para generar líneas celulares estables.

Expresión y purificación de proteína: Para la transfección estable, se transfectaron células CHO-S con ADN plasmídico del EK ABD-DART hCD16-hCD32B. La proteína de ABD-DART se purificó por cromatografía de afinidad usando la versión soluble del antígeno FcRIIB acoplado a Sepharose 4B activada con CNBr. La proteína concentrada se purificó adicionalmente por cromatografía de exclusión molecular usando Superdex 200HR 10/30.

Ensayo de unión por ELISA: Para la captura basada en CD-16, se recubrieron placas con antígeno FcRIIB a una concentración de 2 µg/ml a 4 °C durante una noche. Las placas entonces se bloquearon con peptona al 0,5 % en PBS-T. Las proteínas purificadas diluidas en una dilución en serie de factor dos se unieron en la placa durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó detección usando CD32B biotinilado (50 ng/ml) seguido de HRP conjugada con estreptavidina (1/1000, BD-Pharm). La actividad de HRP se midió mediante la adición de TMB y la placa se leyó en un lector de placa a DO 450 nm.

Para la captura de seroalbúmina humana (HSA), las placas se recubrieron con HSA a una concentración de 2 µg/ml a 4 °C durante una noche. Después de eso, se siguieron los mismos procedimientos para realizar el ELISA de afinidad doble.

Ensayo de ADCC mediada por leucocitos monomorfonucleares de sangre periférica: La citotoxicidad se midió por ensayo de liberación de LDH. Se purificaron leucocitos monomorfonucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre humana completa (Lonza Walkersville, Inc, Gaithersburg, MD) por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron 2×10^4 células diana en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadió una dilución en serie de uno a cuatro de diferentes moléculas de DART o anticuerpo a las células en la placa. Después de eso, se añadieron 6×10^5 PBMC a los mismos pocillos. La placa entonces se incubó durante una noche a 37 °C y en incubadora de un 5 % de CO₂. La placa entonces se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos, se transfieren 50 µl de sobrenadante a una placa de ELISA de fondo plano. Se añaden 50 µl de solución de sustrato de LDH (Promega) a cada pocillo, y la placa se incubó durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Después se añaden 50 µl de solución de parada a cada pocillo, y la placa se lee a 490 nm en una hora. El porcentaje de citotoxicidad de cada pocillo se calcula con una lectura de D.O. sin procesar como

$(\text{Muestra} - \text{AICC}) / (\text{máx. diana} - \text{espontánea diana}) \times 100$

donde AICC es la citotoxicidad celular independiente de anticuerpos. La curva de respuesta a la dosis se genera usando el programa informático Prism.

Estudio farmacocinético: A ratones C57B1/6 se les inyectó una única inyección intravenosa de DART hCD16-hCD32B a 5 mg/kg. Se recogieron suero de ratón antes de la dosis, 2, 30 min; 1, 3, 6, 24 y 72 h. Se cuantificó la concentración de DART hCD16-hCD32B en suero. Los cálculos farmacocinéticos de DART hCD16-hCD32B se realizaron mediante el paquete de programas farmacocinéticos WinNonlin Professional 5.1 (Pharsight Corporation, EE. UU.). Los parámetros se determinaron por análisis no compartimentado (NCA). El análisis no compartimentado se basó en un modelo (modelo 201) que requería una inyección intravenosa del fármaco. Se usó el método lineal trapezoide para el cálculo de parámetros.

Resultados

Expresión y estudio de unión por ELISA: El ABD-DART hCD16-hCD32B se expresó de forma eficaz a una concentración de 6,5 mg por litro en células de mamífero CHO-S. La actividad de unión de la proteína de ABD-DART a los antígenos respectivos se evaluó por ELISA. Los resultados mostraron que ABD-DART hCD16-hCD32B se une simultáneamente con ambos antígenos, CD16 así como con CD32B (figura 46A). El perfil de unión coincide con la unión de la proteína de DART hCD16-hCD32B de control. La afinidad del ABD-DART hCD16-hCD32B purificado por seroalbúmina humana (HSA) también se demostró por ELISA (figura 46B). El resultado mostrado unión fuerte del DART de fusión con ABD a HSA, mientras que no se observó unión con DART hCD16-hCD32B de control.

Citotoxicidad in vitro de ABD-DART: Para demostrar la unión simultánea de este ABD-DART biespecífico a dos antígenos, uno en la célula efectora y uno en la célula diana, se realizó el ensayo de eliminación celular redirigida. Usando PBMC humanos como células efectoras, ABD-DART hCD16-hCD32B indujo citotoxicidad potente, dependiente de la dosis contra líneas de linfocitos B positivos a CD32B, Daudi (figura 47). El resultado mostró que la potencia de ABD-DART era equivalente a la del DART precursor.

Propiedades farmacocinéticas de ABD-DART: Las propiedades farmacocinéticas de ABD-DART hCD16-hCD32B se analizaron por ELISA de muestras de suero después de una única dosis en inyección i.v. en ratones C57B1/6 (figura 48). Ambas proteínas, DART y ABD-DART mostraron eliminación bifásica de la circulación. El estudio PK de ABD-DART mostró un tiempo en circulación prolongado, con una semivida terminal aumentada de 35,1 h en comparación con 1,2 h para DART normales (figura 48, tabla 17). La mejora de las propiedades farmacocinéticas también se

demostró por comparación del área bajo la curva (ABC). Para la construcción ABD-DART el ABC aumentó en un factor de casi 30 después de fusión a ABD (tabla 17).

Tabla 17		
	ABD-DART	DART
T ½ (h)	35,1	1,2
Cmáx (µg/ml)	156,3	103,7
Tmáx (h)	0,5	0,033
ABC	4408,2	138,3

En resumen, se diseñó satisfactoriamente y se produjo una proteína de DART fusionada a dominio de unión a albúmina (mencionada como ABD-DART). Se descubrió que el ABD-DART hCD16-hCD32B retenía las especificidades por sus dos determinantes antigénicos reconocidos: CD16 y CD32B. Se descubrió que ABD-DART mostraba alta afinidad con seroalbúmina humana. La fusión de ABD no reducía la actividad biológica (es decir, la potencia del DART para la eliminación de células tumorales redirigida). La fusión de la molécula de DART con ABD dio lugar a una mejora sustancial (aumento) en su semivida *in vivo*, y consiguió este objetivo sin un aumento drástico en el tamaño. La capacidad de retener un pequeño tamaño es significativa y ventajosa ya que facilita la capacidad del DART de difundir en tejidos tumorales.

6.19 DART de Her2/receptor de linfocitos B

Se construyó un diacuerpo IgDART que contenía regiones variables que pueden unirse a Her2/neu y al receptor de linfocitos T ("TCR").

Como se analiza anteriormente, el TCR se expresa de forma nativa por linfocitos T CD4+ o CD8+, y permite que dichas células reconozcan péptidos antigénicos que se unen y presentan por proteínas de MHC de clase I o clase II de células presentadoras de antígeno. El reconocimiento de un complejo de pMHC (péptido-MHC) por un TCR inicia la propagación de una respuesta inmunitaria celular que da lugar a la producción de citocinas y la lisis de la célula presentadora de antígeno. HER2/neu, un miembro importante de la familia de ErbB, se ha investigado ampliamente a causa de su función en varios carcinomas humanos y en el desarrollo de mamíferos. (Hynes y Stern (1994) Biochim. et Biophys. Acta 1198:165-184; y Dougall et al. (1994) Oncogene 9:2109-2123; Lee et al. (1995) Nature 378:394-398). El gen de HER2/neu humano y la proteína HER2/neu se describen en Semba et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 82:6497-6501 y Yamamoto et al. (1986) Nature 319:230-234, y la secuencia está disponible en GenBank con el número acceso X03363. HER2/neu comprende cuatro dominios: un dominio extracelular al que se une el ligando; un dominio transmembranario lipófilo; un dominio tirosina cinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización del extremo carboxílico que alberga varios restos de tirosina que pueden fosforilarse. (Plowman et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 90:1746-1750). La secuencia del dominio extracelular de HER2/neu (ECD) se describió por Franklin et al. (2004) Cancer Cell. 5(4):317-328, y está disponible en Protein DataBank Record 1S78 (2004).

HER2/neu funciona como receptor del factor de crecimiento y a menudo se expresa por tumores tales como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de ovario y cáncer pulmonar. HER2/neu se sobreexpresa en un 25-30 % de cánceres de mama y ovario humanos, y está asociado con una progresión clínica agresiva y un mal pronóstico en estos pacientes. (Slamon et al. (1987) Science 235:177-182; Slamon et al. (1989) Science 244:707-712). La sobreexpresión de HER2/neu también se ha observado en otros carcinomas, incluyendo carcinomas del estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. (Véase, por ejemplo, King et al. (1985) Science 229:974; McCann et al. (1990) Cancer 65:88-92; Yonemura et al. (1991) Cancer Research 51:1034).

Se han desarrollado varios anticuerpos monoclonales e inhibidores de tirosina cinasa de molécula pequeña dirigidos a HER-1 o HER2/neu, incluyendo, en particular, una variante humanizada de un anticuerpo monoclonal murino conocido como 4D5 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc.) que reconoce un epítipo extracelular (aminoácidos 529 a 627) en el dominio II rico en cisteína de HER2/neu, que reside muy cerca de la región transmembranaria de la proteína. Los estudios han demostrado que en células de cáncer de mama que sobreexpresan HER2/neu, el tratamiento con anticuerpos específicos para HER2/neu en combinación con agentes quimioterápicos (por ejemplo, cisplatino, doxorubicina, taxol) provoca una mayor respuesta citotóxica que el tratamiento con quimioterapia en solitario. (Hancock et al. (1991) Cancer Res. 51:4575-4580; Arteaga et al. (1994) Cancer 54:3758-3765; Pietras et al. (1994) Oncogene 9:1829-1838). Un posible mecanismo por el que los anticuerpos contra HER2/neu podrían potencia la respuesta a agentes quimioterápicos es mediante la modulación de la expresión de la proteína HER2/neu o interfiriendo con la reparación del ADN. (Stancovski et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)

88:8691-8695; Bacus et al. (1992) Cell Growth & Diff. 3:401-411; Bacus et al. (1993) Cancer Res. 53:5251-5261; Klapper et al. (1997) Oncogene 14:2099-2109; Klapper et al. (2000) Cancer Res. 60:3384-3388; Arteaga et al. (2001) J Clinical Oncology 19(18s):32s-40s. Aunque, en determinados casos, los anticuerpos anti-HER2/neu tales como HERCEPTIN® proporcionan beneficio terapéutico a los pacientes, la mayoría de los pacientes con cáncer de mama y otros pacientes muestran respuestas insensibles a dichos anticuerpos. Estas respuestas reflejan, en parte, las diferencias en el grado de la sobreexpresión de HER2/neu por las células cancerosas del paciente.

Como consecuencia de contener regiones variables que pueden unirse a Her2/neu y al receptor de linfocitos T ("TCR"), el DART tiene la capacidad de unirse a células que expresan HER2 y de ese modo adherirse a dichas células mediante un dominio que puede unirse al receptor de linfocitos T. Cuando dichos linfocitos T se unen a este dominio, se activan para iniciar una respuesta inmunitaria que da lugar a la eliminación de las células que expresan HER2.

Las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico para dicho DART se proporcionan a continuación, con las secuencias VL y VH mostradas en texto sencillo, el conector de VL-VH mostrado en texto subrayado y la secuencia codificante del motivo de heterodimerización del extremo C (SEQ ID NO: 313: GFNRGEC o SEQ ID NO: 314: GVEPKSC) mostrado en negrita y cursiva.

Secuencia de aminoácidos de TCRVL-HER2VH (SEQ ID NO: 315)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR
FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGQG TKLEIKGGGS GGGGQVQLQQ
SGPELVKPGA SLKLSTASG FNIKDTYIHW VKQRPEQGLE WIGRIYPTNG YTRYDPKFQD
KATITADTSS NTAYLQVSRL TSED TAVYYC SRWGGDGFYA MDYWGQGASV TVSS ***GFNRGE***
C

Secuencia de ácido nucleico que codifica TCRVL-HER2VH (SEQ ID NO: 316)

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
ctctcttgca gtgccacctc aagtgttaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg
aaagccctta agcgttgat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggg cccatcaagg
ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcaca toagcagcct gcagcctgaa
gattttgcaa cttattactg tcagcagtg agtagtaacc cgtcaccgtt tggccagggg
accaagcttg agatcaaagg aggcgggatcc ggcggcggag gccagggttca gctgcagcag
tctggggccag agcttgtaga gccaggggcc tcaactcaagt tgtcctgtac agcttctggc
ttcaacatta aagacacctata tacaactgg gtgaaacaga ggccctgaaca gggcctggaa
tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt taaactagat atgacccgaa gttccaggac
aagccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgctg
acatctgagg aactgcctg ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct
atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct cc ***ggattcaa caggggagag***
tgt

Secuencia de aminoácidos de HER2VL-TCRVH (SEQ ID NO: 317)

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAWAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVDP
RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTPPTFGG CTKVEIKGGG SGGGQVQLV
QSGAEVKKPG ASVKVSKAS GYKFTSYVMH WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK
GRVTITADKS TSTAYMELSS LRSED TAVHY CARGSYDYD GFVYWGQGL VTVSS ***GVEPK***
SC

Secuencia de ácido nucleico que codifica HER2VL-TCRVH (SEQ ID NO: 318)

gacatcgtga tgaccacagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcca tagggtcagc
atcacctgca agccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctgggtatca gcagaaacca
ggacattctc ccaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat
cgcttactg gcagcagatc tgggacagat ttcaactttca ccatcagcag tgtgcaggct
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg
ggtaccaagg tggagatcaa agggggcgga tccggcggcg gagggcagggt tcagctggtg
cagtctggag ctgagtgtaa gaagcctggg gcctcagtag aggtctcctg caaggccagc
ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac agggccctgg acaaggcctt
gagtgatcg gatattataa tccattacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa
ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac
gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctcc ***ggagt tgagccaaa***
tcttgt

En una realización preferida, dichas construcciones se modifican para que contengan un dominio de enrollamiento-E o enrollamiento-K que facilite la formación de heterodímeros (es decir, dímeros TCRVL-HER2VH x HER2VL-TCRVH). Las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico para dicho DART se proporcionan a continuación, con las secuencias VL y VH mostradas en texto sencillo, el conector de VL-VH mostrado en texto subrayado y la secuencia codificante del conector que contiene Cys para la dimerización (GGCGGG; restos 2-7 de la SEQ ID NO: 267) mostrada en cursiva. El dominio de heterodimerización de enrollamiento-E o enrollamiento-K está doblemente subrayado (la secuencia de "enrollamiento-E" preferida es 4 repeticiones heptaméricas de EVAALEK; SEQ ID NO: 299; la secuencia de "enrollamiento-K" preferida es 4 repeticiones heptaméricas de r KVAALKE (SEQ ID NO: 300). La secuencia después del enrollamiento-E o el enrollamiento-K no tiene función adjudicada.

10 Secuencia de aminoácidos de TCRVL-HER2VH-enrollamientoE (SEQ ID NO: 319)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR
FSGSGSGTEF TLTISLQPE DFATYYCQW SSNPLTFGQG TKLEIKGGGS GGGGQVQLQQ
SGPELVKPGA SLKLSCTASG FNIKDTYIHW VKQRPEQGLE WIGRIYPTNG YTRYDPKFQD
KATITADTSS NTAYLQVSRL TSEDVAVYYC SRWGGDGFYA MDYWGQGASV TVSS GGCGGG
EVAALEKEVA ALEKEVALE KEVAALEKGG GNS

Secuencia de ácido nucleico que codifica TCRVL-HER2VH-enrollamientoE (SEQ ID NO: 320)

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
ctctcctgca gtgccacctc aagtgttaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg
aaagcccta agecgtgat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggg cccatcaagg
ttcagcgga gtggatctgg gacagaattt actctcaca tcagcagcct gcagcctgaa
gattttgcaa cttattactg tcagcagtg agtagtaacc cgtcacggtt tggccagggg
accaagcttg agatcaaagg aggcggtacc ggcgggcgag gccaggttca gctgcagcag
tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcaactcaagt tgcctgtac agcttctggc
ttcaacatta aagacaccta tataactgg gtgaaacaga ggctgaaca gggcctggaa
tggattgaa ggatttatcc tacgaatgg tatactagat atgacccgaa gttccaggac
aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggc cagccgctg
acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct
atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct ccggaggatg tggcgggtgga
gaagtggccg cactggagaa agaggttgc gctttggaga aggaggtgc tgcactgaa
aaggaggtcg cagccctgga gaaaggcgcc ggaattct

Secuencia de aminoácidos de HER2VL-TCRVH-enrollamientoK (SEQ ID NO: 321)

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQK GHSPKLLIYS ASFRYTGVPD
RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQ HYTTPPTFGG GTKVEIKGGG SGGGQVQLV
QSGAEVKKPG ASVKVSKAS GYKFTSYVMH WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK
GRVTITADKS TSTAYMELSS LRSEDVAVHY CARGSYDYD GFVYWGQGL VTVSSGGCGG
15 GKVAALKEKV AALKEKVAAL KEKVAALKEG GNS

Secuencia de ácido nucleico que codifica HER2VL-TCRVH-enrollamientoK (SEQ ID NO: 322)

gacatcgtga tgaccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggga tagggtcagc
atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggatca gcagaaacca
ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcacccctcc ggtacactgg agtccctgat
cgcttacttg gcagcagatc tgggacagat tcaactttca ccatcagcag tgtgcaggct
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcgagggg
ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcgcg gaggccagg tcagctggtg
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctctctg caaggccagc

ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccttg acaagggtt
gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa
ggcagagtc agattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc
ctgagatccg agtacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggaactacta tgattacgac
gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagg atgtggcggt
ggaaaagtgg ccgactgaa ggagaaagtt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt
aaggaaaagg tcgcagccct gaaaggaggc ggcgggaatt ct

20 Se ensayaron moléculas de DART que tienen dominios de unión a Her2 y receptor de linfocitos T (TCR) para su capacidad de mediar la citotoxicidad en múltiples líneas celulares de cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de vejiga que se habían caracterizado previamente por mostrar bajos niveles de expresión de HER2 (y, por tanto, que son resistentes a tratamiento con el anticuerpo anti-Her2/neu, Herceptin®. Las líneas celulares de cáncer de mama ensayadas son ZR75-1 (HER2 2+) (figura 49A), MCF-7 (HER2 1+) (figura 49B) y MDA-MB468 (HER2-va) (figura

49C). Las líneas celulares que no son de cáncer de mama ensayadas son HT-29 (línea celular de cáncer de colon) (figura 49D) y SW780 (línea celular de cáncer de vejiga) (figura 49E). Como se muestra en la figura 49A-E, dichas moléculas de DART eran sustancialmente más eficaces que HERCEPTIN® en la mediación de la citotoxicidad de las líneas celulares derivadas de tumor, tanto en términos de las concentraciones requeridas para conseguir citotoxicidad equivalente como en términos de los niveles máximos de citotoxicidad observados.

Pueden hacerse muchas modificaciones y variaciones de esta divulgación sin alejarse de su alcance, como será evidente para los expertos en la materia.

Lista de secuencias

<110> MacroGenics, Inc. Johnson, Leslie S. Huang, Ling S.

10 <120> Diacuerpos covalentes y usos de los mismos

<130> P102257EP52

<150> US 60/671657

<151> 15/04/2005

<150> US 11/409339

15 <151> 17/04/2006

<150> PCT/US06/014481

<151> 17/04/2006

<150> US 60/945523

<151> 21/06/2007

20 <150> US 61/019051

<151> 04/01/2008

<150> US 12/138867

<151> 13/06/2008

<150> PCT/US08/66957

25 <151> 13/06/2008

<150> US 61/139352

<151> 19/12/2008

<150> US 61/156035

<151> 27/02/2009

30 <150> US 61/256779

<151> 30/10/2009

<160> 322

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

35 <211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2
 Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 1 5 10
 <210> 3
 10 <211> 60
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3
 Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
 1 5 10 15
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 20 25 30
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
 35 40 45
 Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 50 55 60
 15 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
 20 1 5 10
 <210> 5
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 5

ES 2 733 067 T3

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 6

<211> 216

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

ES 2 733 067 T3

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 7

<211> 217

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

ES 2 733 067 T3

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Gln Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asn Trp Leu Asp Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 8

<211> 217

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

ES 2 733 067 T3

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215

<210> 9

<211> 237

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

ES 2 733 067 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

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

Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
115 120 125

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145 150 155 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
165 170 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
180 185 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230 235

<210> 10

<211> 8

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 11

<211> 244

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 11

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
 20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
 165 170 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
 180 185 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
 195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
 210 215 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Cys

<210> 12

<211> 240

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

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

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
130 135 140

Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn
165 170 175

Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val Val Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230 235 240

<210> 13

ES 2 733 067 T3

<211> 241

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro
115 120 125

Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser
130 135 140

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln
145 150 155 160

Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp
165 170 175

Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys
180 185 190

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro
195 200 205

Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe
210 215 220

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly
225 230 235 240

Cys

<210> 14

ES 2 733 067 T3

<211> 470

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

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

Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
115 120 125

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145 150 155 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
165 170 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
180 185 190

5

ES 2 733 067 T3

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
 195 200 205
 Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 210 215 220
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 15

<211> 477

ES 2 733 067 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
165 170 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
180 185 190

ES 2 733 067 T3

Val	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	195	200	205
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Gly	Asp	Ser	Asp	Tyr	Tyr	210	215	220
Ser	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	225	230	235
Leu	Gly	Gly	Cys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	245	250	255
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	260	265	270
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	275	280	285
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	290	295	300
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	305	310	315
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	325	330	335
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	340	345	350
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	355	360	365
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	370	375	380
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	385	390	395
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	405	410	415
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	420	425	430
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	435	440	445
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	450	455	460
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				465	470	475

ES 2 733 067 T3

<210> 16

<211> 243

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

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

Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
115 120 125

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145 150 155 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
165 170 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys

ES 2 733 067 T3

180 185 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg
225 230 235 240

Gly Glu Cys

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> conector más extremo C de cadena kappa de IgG humana

<400> 17

Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5 10

10 <210> 18

<211> 477

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

ES 2 733 067 T3

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
 100 105 110
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 115 120 125
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 130 135 140
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
 165 170 175
 Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
 180 185 190
 Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
 195 200 205
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
 210 215 220
 Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Cys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 245 250 255
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 260 265 270
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 275 280 285
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 290 295 300
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 305 310 315 320
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 325 330 335
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 340 345 350

ES 2 733 067 T3

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
355 360 365

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
370 375 380

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385 390 395 400

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
405 410 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
420 425 430

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
435 440 445

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
450 455 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 19

<211> 485

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
85 90 95

ES 2 733 067 T3

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 100 105 110
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 115 120 125
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 130 135 140
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 165 170 175
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 180 185 190
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 195 200 205
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 210 215 220
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 245 250 255
 Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe
 260 265 270
 Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 275 280 285
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro
 290 295 300
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 305 310 315 320
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
 325 330 335
 Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

ES 2 733 067 T3

340

345

350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
355 360 365

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
370 375 380

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala
385 390 395 400

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr
405 410 415

Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val
420 425 430

Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
435 440 445

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
450 455 460

Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
465 470 475 480

Ser Leu Gly Gly Cys
485

<210> 20

<211> 469

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

ES 2 733 067 T3

65		70		75		80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys						
		85		90		95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln						
		100		105		110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu						
		115		120		125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro						
		130		135		140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn						
		145		150		155
				155		160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu						
		165		170		175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val						
		180		185		190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln						
		195		200		205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly						
		210		215		220
Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu						
		225		230		235
				235		240
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe						
		245		250		255
Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro						
		260		265		270
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro						
		275		280		285
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile						
		290		295		300
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser						
		305		310		315
				315		320

ES 2 733 067 T3

Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
325 330 335

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
340 345 350

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
355 360 365

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala
370 375 380

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr
385 390 395 400

Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val
405 410 415

Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
420 425 430

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
435 440 445

Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
450 455 460

Ser Leu Gly Gly Cys
465

<210> 21

<211> 466

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

ES 2 733 067 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
 115 120 125
 Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 130 135 140
 Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 145 150 155 160
 Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
 165 170 175
 Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 180 185 190
 Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
 195 200 205
 Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 210 215 220
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 225 230 235 240
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

ES 2 733 067 T3

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 22

<211> 246

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

ES 2 733 067 T3

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
165 170 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
180 185 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
245

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 24

<211> 5

10 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR1 de región variable de cadena pesada de 2B6

<400> 24
Asn Tyr Trp Ile His
1 5
<210> 25
<211> 5
5 <212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> CDR1 de región variable de cadena pesada de 3H7
<400> 25
Asp Ala Trp Met Asp
10 1 5
<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial
15 <220>
<223> CDR2 de región variable de cadena pesada de 2B6
<400> 26
Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly
<210> 27
20 <211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> CDR2 de región variable de cadena pesada de 3H7
25 <400> 27
Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly
<210> 28
<211> 12
<212> PRT
30 <213> artificial
<220>

<223> CDR3 de región variable de cadena pesada de 2B6

<400> 28

Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 29

5 <211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR3 de región variable de cadena pesada de 3H7

10 <400> 29

Tyr Ser Pro Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> CDR1 de región variable de cadena ligera de 2B6

<400> 30

Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

20 <210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

25 <223> CDR1 de región variable de cadena ligera de 3H7

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
 1 5 10

<210> 32

<211> 7

30 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR2 de región variable de cadena ligera de 2B6

<400> 32

Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5
 <210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> CDR2 de región variable de cadena ligera de 2B6
 <400> 33
Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5
 10 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> CDR2 de región variable de cadena ligera de 2B6
 <400> 34
Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5
 <210> 35
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> CDR2 de región variable de cadena ligera de 3H7
 <400> 35
Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
 25 1 5
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> CDR3 de región variable de cadena ligera de 2B6
 <400> 36
Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 37

<211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 5 <223> CDR3 de región variable de cadena ligera de 3H7
 <400> 37
 Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 38
 <211> 121
 10 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> región variable de cadena pesada de 2B6
 <400> 38
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 15 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 39
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> región variable de cadena ligera de 2B6 Hu2B6VL-1

ES 2 733 067 T3

<400> 39

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

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

<210> 40

<211> 107

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera de 2B6 humanizada Hu2B6VL-2

<400> 40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

10 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

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

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220>

5 <223> región variable de cadena ligera de 2B6 humanizada Hu2B6VL-3

<400> 41

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

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

<210> 42

<211> 107

10 <212> PRT

<213> *Mus* sp.

<400> 42

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Arg Arg Leu Ile
35 40 45

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

Ser Trp Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> sitio de unión a IgG del receptor FcγRIIB

<400> 43

Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn
1 5

10 <210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> sitio de unión a IgG del receptor FcγRIIB

<400> 44

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn
1 5

<210> 45

<211> 9

20 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> sitio de unión a IgG del receptor FcγRIIB

<400> 45

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

25 <210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

30 <220>

<223> sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIB

<400> 46

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 47

5 <211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIB

10 <400> 47

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIB

<400> 48

Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

20 <210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

25 <223> sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIB

<400> 49

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn
1 5

<210> 50

<211> 9

30 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> sitio de unión a IgG para el receptor FcgammaRIIB

<400> 50

Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn
 1 5
 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIB
 <400> 51
Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
 1 5
 10 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIB
 <400> 52
Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
 1 5
 <210> 53
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIB
 <400> 53
Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
 25 1 5
 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIB
 <400> 54
Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
 1 5
 <210> 55

<211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 5 <223> Cebador Lgh321F
 <400> 55
 cgagctagct ctatgagaga tcacagttct ctctac 36
 <210> 56
 <211> 47
 10 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh318R
 <400> 56
 15 gcctccgcct ccggatccgc ctctttgat ctccaccttg gtcctc 47
 <210> 57
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> Cebador Lgh319F
 <400> 57
 ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtt cagctggtgc agtctgg 47
 <210> 58
 25 <211> 43
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh320R
 30 <400> 58
 ttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tgg 43
 <210> 59
 <211> 46
 <212> ADN
 35 <213> artificial
 <220>

<223> Cebador Lgh315R
 <400> 59
 gcctccgcct ccggatccgc ctctttgat ctcaagcttg gtcccc 46
 <210> 60
 5 <211> 48
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh316F
 10 <400> 60
 ggaggcggat ccggaggcgg aggccagggt accctgagag agtctggc 48
 <210> 61
 <211> 47
 <212> ADN
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh317R
 <400> 61
 ttgaattcc tagcagcctc ccagtgagct cacagtgacc agagtcc 47
 20 <210> 62
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> Cebador Lgh339R
 <400> 62
 ctcaacgcag cctcccagtg agctcac 27
 <210> 63
 <211> 31
 30 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh340R
 <400> 63
 35 aacgcagcct ccagtgagg agacggtgac c 31
 <210> 64

<211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 5 <223> Cebador Lgh366R
 <400> 64
 ttggaattct atttaccgg agacagg 27
 <210> 65
 <211> 33
 10 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador Lhg367F
 <400> 65
 15 ctgggaggct gcgcagagcc caaatctgt gac 33
 <210> 66
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> Cebador Lgh368R
 <400> 66
 gtcacaagat ttgggctctg cgcagcctcc cag 33
 <210> 67
 25 <211> 50
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh369R
 30 <400> 67
 ttggaattct aacactctcc cctgttgaag cagcctccca gtgaggagac 50
 <210> 68
 <211> 118
 <212> PRT
 35 <213> artificial
 <220>

ES 2 733 067 T3

<223> región variable de cadena pesada anti-CD16A humanizada Hu3G8VH-1

<400> 68

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

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69

5 <211> 118

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> región variable de cadena pesada anti-CD16A humanizada Hu3G8VH-5

10 <400> 69

ES 2 733 067 T3

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

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 70

<211> 117

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> región variable de cadena pesada anti-CD16A humanizada Hu3G8VH-22

<400> 70

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

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

Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

ES 2 733 067 T3

35

40

45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 71

<211> 111

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera anti-CD16A humanizada Hu3G8VL-1

<400> 71

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

10 <210> 72

<211> 111

<212> PRT

<213> artificial

ES 2 733 067 T3

<220>

<223> región variable de cadena ligera anti-CD16A humanizada Hu3G8VL-43

<400> 72

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

5 <210> 73

<211> 111

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> región variable de cadena ligera anti-CD16A humanizada Hu3G8VL-22

<400> 73

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

ES 2 733 067 T3

65 70 75 80

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

Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 74

<211> 24

<212> ADN

5 <213> secuencia de ADN de la SEQ ID NO: 10

<400> 74

ggaggcggat ccggaggcgg aggc 24

<210> 75

<211> 18

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 75

ttcaacaggg gagagtgt 18

<210> 76

15 $\langle 211 \rangle$ 30

<212> ADN

<213> artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> conector más extremo C de cadena kappa de IgG humana

20 <400> 76

ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt 30

<210> 77

$\langle 211 \rangle$ 6

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 77

Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 78

<211> 18

30 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 78

gttgagccca aatcttgt 18

<210> 79

<211> 118

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 79

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

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80

<211> 354

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 80

cagggttacc	tgaaagagtc	tggccctggg	atattgcagc	cctcccagac	cctcagtcctg	60
acttgttctt	tctctgggtt	ttcactgagg	acttctggta	tgggtgtagg	ctggattcgt	120
cagccttcag	ggaagggctc	agagtggctg	gcacacattt	ggtgggatga	tgacaagcgc	180
tataatccag	cctgaagag	cogactgaca	atctccaagg	atacctccag	caaccaggta	240
ttcctcaaaa	tcgccagtgt	ggacactgca	gatactgcca	catactactg	tgctcaaata	300
aaccccgct	ggtttgctta	ctggggccaa	gggactctgg	tcactgtgag	ctca	354

<210> 81

15 <211> 354

<212> ADN

ES 2 733 067 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 81

```
cagggtaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc ccacacagac cctcacactg      60
acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt      120
cagcctcccg ggaaggctct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc      180
tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctcaa aaaccaggta      240
gtcctcacia tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata      300
aaccgccctt ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtgag ctca          354
```

5 <210> 82

<211> 111

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 82

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
          20          25          30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
          35          40          45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
          50          55          60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65          70          75          80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
          85          90          95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100          105          110
```

10

<210> 83

<211> 333

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 83

ES 2 733 067 T3

gacactgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggtgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180
gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 84

<211> 332

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera anti-CD16A humanizada Hu3G8VL-1

<400> 84

gacatcgtga tgaccaatc tccagactct ttggtgtgt ctctagggga gagggccacc 60
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180
ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
10 acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aa 332

<210> 85

<211> 121

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> región variable de cadena pesada de 2B6 humanizada

<400> 85

ES 2 733 067 T3

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

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

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

Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86

<211> 363

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> región variable de cadena pesada de 2B6 humanizada

<400> 86

cagggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc aactactgga tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gattggagtg attgatcctt ctgatactta tccaaattac 180

aataaaaagt tcaagggcag agtcaccatg accgtagtcg tatocacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaacggt 300

gattccgatt attactctgg tatggactac tgggggcaag ggaccacggt caccgtctcc 360

10 tca 363

<210> 87

<211> 111

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> región variable de cadena ligera de 2B6 humanizada

<400> 87

ES 2 733 067 T3

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 88

<211> 321

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera de 2B6 humanizada

<400> 88

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtcctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccggtcac gttcggcgga 300

10 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 89

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> sitio de reconocimiento de escisión de trombina

<400> 89

Leu Val Pro Arg Gly Ser

1 5

<210> 90
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> sitio de reconocimiento de escisión de factor Xa
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 10 <223> Xaa=Glu o Asp
 <400> 90
 Ile Xaa Gly Arg
 1
 <210> 91
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sitio de reconocimiento de escisión de enterocinasa
 <400> 91
 Asp Asp Asp Asp Lys
 20 1 5
 <210> 92
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> sitio de reconocimiento de escisión de furina
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(3)
 30 <223> Xaa=cualquier aminoácido
 <400> 92
 Arg Xaa Xaa Arg
 1
 <210> 93
 <211> 4
 35 <212> PRT

- <213> artificial
- <220>
- <223> sitio de reconocimiento de escisión de furina preferido
- <220>
- 5 <221> VARIANTE
- <222> (2)..(2)
- <223> Xaa=cualquier aminoácido
- <220>
- <221> VARIANTE
- 10 <222> (3)..(3)
- <223> Xaa=Lys o Arg
- <400> 93
- Arg Xaa Xaa Arg**
- 1**
- <210> 94
- 15 <211> 7
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- <223> sitio de reconocimiento de escisión de AcTEV
- 20 <400> 94
- Gln Asn Leu Tyr Phe Gln Gly**
- 1 5**
- <210> 95
- <211> 487
- <212> PRT
- 25 <213> artificial
- <220>
- <223> precursor de poliproteína de diacuerpo covalente
- <400> 95

ES 2 733 067 T3

Asp	Thr	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	1	5	10	15
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Phe	Asp	20	25	30	
Gly	Asp	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	35	40	45	
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Thr	Thr	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	50	55	60	
Arg	Phe	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	65	70	75	80
Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	85	90	95	
Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	100	105	110	
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Glu	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	115	120	125	
Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	130	135	140	
Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	145	150	155	160
Thr	Thr	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Gly	Asp	165	170	175	
Thr	His	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	180	185	190	

ES 2 733 067 T3

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu
 195 200 205
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
 210 215 220
 Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Cys Gly Gly Arg Ala Lys Arg Asp Val Gln Met Thr Gln
 245 250 255
 Ser Pro Ser Asn Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Asn
 260 265 270
 Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln
 275 280 285
 Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu Leu Met Tyr Asp Gly Ser Thr Leu
 290 295 300
 Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 305 310 315 320
 Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Gly Leu Tyr
 325 330 335
 Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Ala Thr Phe Gly Ser Gly Thr
 340 345 350
 Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr
 355 360 365
 Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly
 385 390 395 400
 Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala
 405 410 415
 His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
 420 425 430
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
 435 440 445
 Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
 450 455 460
 Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480
 Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
 485

<210> 96

<211> 1464

<212> ADN

<213> artificial

5 <220>

<223> secuencia de ADN de la SEQ ID NO: 97 (precursor de poliproteína de diacuerpo covalente)

<400> 96

gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggtgtgt ctctagggca gagggccacc	60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac	120
caacagaaac caggacagcc acccaaatc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct	180
gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	240
cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac	300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag	360
gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaagggtccct gaaactctcg	420
tgtgcagcct caggattcac ttctcagtgc tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca	480
acgacgggtc tggagtgggt cgcattccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga	540
gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg	600
caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg	660
ggaataccta cagggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag ttctcagtcac tgtctcctca	720
ctgggaggct cgggcgggag agctaagagg gatgtccaga tgaccagtc tccatctaata	780
cttgctgcct ctcttgagga aagtgtttcc atcaattgca aggcaagtga gagcattagc	840
aagtatttag cctggatatc acagaaacct gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat	900
gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg aggttcagtg gcagtggatc tggtagagat	960
ttcactctca ccatcagaag cctggagcct gaagattttg gactctatta ctgtcaacag	1020
cattatgaat atccagccac gttcggttct gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga	1080
tccggaggcg gaggccaggt taccctgaaa gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc	1140
cagaccctca gtctgacttg ttctttctct gggttttcac tgaggacttc tggtaggggt	1200
gtaggctgga ttctgcagcc ttccagggaag ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg	1260
gatgatgaca agcgtataa tccagccctg aagagccgac tgacaatctc caaggatacc	1320
tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac	1380
tactgtgctc aaataaacc cgctgtgtt gcttactggg gccaaaggac tctggtcact	1440
gtgagctcac tgggaggctg ctag	1464

10 <210> 97

<211> 511

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> precursor de poliproteína de diacuerpo covalente

<400> 97

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp

ES 2 733 067 T3

165										170					175				
Thr	His	Tyr	Arg 180	Asp	Ser	Val	Lys	Gly 185	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser 190	Arg	Asp				
Asn	Ala	Lys 195	Ser	Ser	Leu	Tyr	Leu 200	Gln	Met	Asp	Ser	Leu 205	Arg	Ser	Glu				
Asp	Thr 210	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys 215	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr 220	Gly	Ile	Pro	Thr				
Gly 225	Val	Met	Asp	Ala	Trp 230	Gly	Gln	Gly	Val	Ser 235	Val	Thr	Val	Ser	Ser 240				
Leu	Gly	Gly	Cys	Gly 245	Gly	Arg	Ala	Lys	Arg 250	Ala	Pro	Val	Lys	Gln 255	Thr				
Leu	Asn	Phe	Asp 260	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala 265	Gly	Asp	Val	Glu	Ser 270	Asn	Pro				
Gly	Pro	Asp 275	Val	Gln	Met	Thr	Gln 280	Ser	Pro	Ser	Asn	Leu 285	Ala	Ala	Ser				
Pro	Gly 290	Glu	Ser	Val	Ser	Ile 295	Asn	Cys	Lys	Ala	Ser 300	Glu	Ser	Ile	Ser				
Lys 305	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr 310	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly 315	Lys	Ala	Asn	Lys	Leu 320				
Leu	Met	Tyr	Asp	Gly 325	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser 330	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg 335	Phe				
Ser	Gly	Ser	Gly 340	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe 345	Thr	Leu	Thr	Ile	Arg 350	Ser	Leu				
Glu	Pro	Glu 355	Asp	Phe	Gly	Leu	Tyr 360	Tyr	Cys	Gln	Gln	His 365	Tyr	Glu	Tyr				
Pro	Ala 370	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly 375	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile 380	Lys	Gly	Gly	Gly				
Ser 385	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln 390	Val	Thr	Leu	Lys	Glu 395	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile 400				
Leu	Gln	Pro	Ser	Gln 405	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr 410	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly 415	Phe				

ES 2 733 067 T3

Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser
420 425 430

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys
435 440 445

Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
450 455 460

Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp
465 470 475 480

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
485 490 495

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
500 505 510

<210> 98

<211> 1536

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> secuencia de ADN de la SEQ ID NO: 99 (precursor de poliproteína de diacuerpo covalente)

<400> 98

gacactgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggtgtgt ctctagggca gagggccacc	60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac	120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct	180
gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	240
cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac	300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag	360
gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtcctt gaaactctcg	420
tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca	480
acgacgggtc tggagtgggt cgcattccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga	540
gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg	600
caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg	660
ggaataccta cagggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca	720
ctgggaggct gcggcgggag agctaaggag gccctgtga agcagaccct gaacttcgac	780
ctgctgaagc tggccggaga cgtggagagc aaccccgggc ccgatgtcca gatgaccag	840
tctccatcta atcttgctgc ctctcctgga gaaagtgttt ccatcaattg caaggcaagt	900

gagagcatta gcaagtat ttt agcctggat ctacagaaac ctgggaaagc aaataagctt 960
 cttatgtacg atgggtcaac tttgcaatct ggaattocat cgagggttcag tggcagtggg 1020
 tctggtacag atttcaactct caccatcaga agcctggagc ctgaagattt tggactctat 1080
 tactgtcaac agcattatga atatccagcc acgttcgggt ctgggaccaa gctggagatc 1140
 aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag gttaccctga aagagtctgg ccctgggata 1200
 ttgcagccct cccagaccct cagtctgact tgttctttct ctgggttttc actgaggact 1260
 tctggtatgg gtgtaggctg gattcgtcag ccttcaggga agggctctaga gtggctggca 1320
 cacatttggt gggatgatga caagcgctat aatccagccc tgaagagccg actgacaatc 1380
 tccaaggata cctccagcaa ccaggatttc ctcaaaatcg ccagtgtgga cactgcagat 1440
 actgccacat actactgtgc tcaaataaac cccgcctggt ttgcttactg gggccaaggg 1500
 actctggtca ctgtgagctc actgggaggc tgetag 1536

<210> 99

<211> 239

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 99

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
 115 120 125

ES 2 733 067 T3

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145 150 155 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
165 170 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
180 185 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 100

<211> 720

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 100

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc	60
ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca	120
gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct	240
gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccggtcac gttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt taccctgaga	360
gagtctggcc ctgcgctggg gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct	420
gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccggaag	480
gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg	540
aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc	600
aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt	660
gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtgagctcat tcaacagggg agagtgttag	720

<210> 101

<211> 246

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 101

ES 2 733 067 T3

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
165 170 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
180 185 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Val Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 102

<211> 741

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 102

gacatcgtga tgaccaaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180
ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag 360
gttcagctgg tgcaagtctgg agctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggctctc 420
tgcaaggctt ctggttacac ctttaccac tactggatac actgggtgcg acaggcccct 480
ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat 540
aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg 600
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat 660
tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctca 720
gttgagccca aatcttggtta g 741

<210> 103

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR1 de VH de 3G8

<400> 103

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

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

10 <210> 104

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencias VH derivadas de FR1 de VH de 3G8

<400> 104

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

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

<210> 105

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR1 de VH de 3G8

5 <400> 105

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

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

<210> 106

<211> 30

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR1 de VH de 3G8

<400> 106

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

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

15 <210> 107

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencias VH derivadas de FR1 de VH de 3G8

<400> 107

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

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

<210> 108

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de CDR1 de VH* de 3G8

<400> 108

Thr Ser Gly Met Gly Val Gly
1 5

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de CDR1 de VH* de 3G8

<400> 109

Thr Ser Gly Val Gly Val Gly
1 5

10 <210> 110

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencias VH derivadas de FR2 de VH* de 3G8

<400> 110

Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 111

<211> 14

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR2 de VH* de 3G8

<400> 111

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

25 <210> 112

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencias VH derivadas de CDR2 de VH* de 3G8

<400> 112

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 113

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Secuencias VH derivadas de CDR2 de VH* de 3G8
 <400> 113
 His Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 114
 <211> 16
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VH derivadas de CDR2 de VH* de 3G8
 <400> 114
 His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
 15 1 5 10 15
 <210> 115
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Secuencias VH derivadas de CDR2 de VH* de 3G8
 <400> 115
 His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 116
 25 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VH derivadas de CDR2 de VH* de 3G8
 30 <400> 116
 His Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 117
 <211> 16
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencias VH derivadas de CDR2 de VH* de 3G8

<400> 117

Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
5 1 5 10 15

<210> 118

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencias VH derivadas de CDR2 de VH* de 3G8

<400> 118

His Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 119

15 $\langle 211 \rangle$ 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencias VH derivadas de CDR2 de VH* de 3G8

20 <400> 119

Leu Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

$\langle 210 \rangle$ 120

<211> 16

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencias VH derivadas de CDR2 de VH* de 3G8

<400> 120

His Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

30 <210> 121

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencias VH derivadas de CDR2 de VH* de 3G8

<400> 121

Leu	Ile	Trp	Trp	Asn	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 122

5 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

10 <400> 122

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Val	Phe	Leu	Lys
1				5						10				15	

Ile	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln
			20					25				

<210> 123

<211> 29

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 123

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25				

20 <210> 124

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 124

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln
			20					25				

<210> 125

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 125

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr
			20					25				

<210> 126

<211> 29

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 126

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys
			20					25				

15

<210> 127

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 127

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala
			20					25				

<210> 128

25 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 128

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 129

<211> 29

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 129

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

10 Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 130

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 130

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 131

20 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

25 <400> 131

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 132

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 132

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Val	Phe	Leu	Lys
1				5					10					15	

Ala	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln
			20					25				

<210> 133

10 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

15 <400> 133

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Thr	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25				

<210> 134

<211> 29

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 134

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Thr	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln
			20					25				

25 <210> 135

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 135

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Thr	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr
			20				25					

<210> 136

5 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

10 <400> 136

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Thr	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys
			20				25					

<210> 137

<211> 29

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 137

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Thr	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala
			20				25					

20 <210> 138

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 138

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 139

<211> 29

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 139

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

10 <210> 140

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 140

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 141

<211> 29

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 141

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

25 <210> 142

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 142

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Val	Phe	Leu	Lys
1				5				10						15	

Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln
			20					25				

<210> 143

<211> 29

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 143

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5				10						15	

Asn	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25				

15

<210> 144

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 144

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5				10						15	

Asn	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln
			20					25				

<210> 145

25 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 145

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 146

<211> 29

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 146

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

10 Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 147

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 147

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 148

20 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

25 <400> 148

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 149

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 149

Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Asn	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25				

<210> 150

10 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

15 <400> 150

Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Asn	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	His
			20					25				

<210> 151

<211> 29

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 151

Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Asn	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln
			20					25				

25 <210> 152

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 152

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Val	Phe	Leu	Lys
1				5					10					15	

Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln
			20					25				

<210> 153

5 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

10 <400> 153

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25				

<210> 154

<211> 29

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 154

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln
			20					25				

20 <210> 155

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 155

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 156

<211> 29

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 156

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

10 <210> 157

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 157

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 158

<211> 29

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 158

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

25

<210> 159

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 159

Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25				

<210> 160

<211> 29

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 160

Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	His
			20					25				

15

<210> 161

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencias VH derivadas de FR3 de VH* de 3G8

<400> 161

Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln
			20					25				

<210> 162

25 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de CDR3 de VH* de 3G8

<400> 162
Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5
<210> 163
<211> 8
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencias VH derivadas de CDR3 de VH* de 3G8
<400> 163
Ile Asn Pro Ala Trp Phe Asp Tyr
10 1 5
<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<223> Secuencias VH derivadas de CDR3 de VH* de 3G8
<400> 164
Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Ala Tyr
1 5
<210> 165
20 <211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencias VH derivadas de CDR3 de VH* de 3G8
25 <400> 165
Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Asp Tyr
1 5
<210> 166
<211> 11
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencias VH derivadas de FR4 de VH* de 3G8
<400> 166
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10

<210> 167
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencias VH derivadas de FR4 de VH* de 3G8
 <400> 167

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 168

10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de FR1 de VL* de 3G8

15 <400> 168

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

<210> 169
 <211> 15
 <212> PRT

20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de FR1 de VL* de 3G8
 <400> 169

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

25 <210> 170
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

30 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 170

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Gly	Asp	Ser	Phe	Met	Asn
1				5					10	

<210> 171
 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

5 <400> 171

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Gly	Asp	Ser	Phe	Met	Asn
1				5					10	

<210> 172

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

<400> 172

Lys	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	Asp	Ser	Phe	Met	Asn
1				5					10	

15 <210> 173

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

<400> 173

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn
1				5					10	

<210> 174

<211> 11

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

<400> 174

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Gly	Asp	Ser	Phe	Leu	Asn
1				5					10	

30 <210> 175

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 175
 Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
 1 5 10

5 <210> 176
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

10 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 176
 Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 177
 <211> 11

15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 177
 Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
 1 5 10

20 <210> 178
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 178
 Arg Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
 1 5 10

<210> 179

30 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

<400> 179
 Lys Ser Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
 1 5 10
 <210> 180
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 180
 Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 10 1 5 10
 <210> 181
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 181
 Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
 1 5 10
 <210> 182
 20 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 25 <400> 182
 Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
 1 5 10
 <210> 183
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 183
 Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 184
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 184
 Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
 1 5 10
 <210> 185
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 15 <400> 185
 Arg Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
 1 5 10
 <210> 186
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 186
 Lys Ser Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
 1 5 10
 25 <210> 187
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 187
 Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10
 <210> 188
 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

5 <400> 188

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 189

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

<400> 189

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

15 <210> 190

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

<400> 190

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 191

<211> 11

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

<400> 191

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

30 <210> 192

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 192
 Arg Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
 1 5 10

5 <210> 193
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

10 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 193
 Lys Ser Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
 1 5 10

<210> 194
 <211> 11

15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 194
 Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10

20 <210> 195
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 195
 Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
 1 5 10

<210> 196

30 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

<400> 196
 Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
 1 5 10

<210> 197

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

<400> 197

10 Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 198

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

<400> 198

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
 1 5 10

<210> 199

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

25 <400> 199

Arg Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
 1 5 10

<210> 200

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8

<400> 200

Lys Ser Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
 1 5 10

<210> 201
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 201
 Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10
 <210> 202
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 15 <400> 202
 Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
 1 5 10
 <210> 203
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 203
 Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
 1 5 10
 25 <210> 204
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Secuencias VL derivadas de CDR1 de VL* de 3G8
 <400> 204
 Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 205
 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de FR2 de VL* de 3G8

5 <400> 205

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ala	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5				10						15	

<210> 206

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR2 de VL* de 3G8

<400> 206

Thr	Thr	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
1				5		

15 <210> 207

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencias VL derivadas de CDR2 de VL* de 3G8

<400> 207

Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210> 208

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR2 de VL* de 3G8

<400> 208

Trp	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
1				5		

30 <210> 209

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR2 de VL* de 3G8
 <400> 209
 Thr Thr Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5
 5 <210> 210
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Secuencias VL derivadas de CDR2 de VL* de 3G8
 <400> 210
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5
 <210> 211
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR2 de VL* de 3G8
 <400> 211
 Asp Ala Ser Asn Leu Ala Thr
 1 5
 20 <210> 212
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR2 de VL* de 3G8
 <400> 212
 Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 213
 30 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR2 de VL* de 3G8

<400> 213
 Ser Thr Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 214
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR2 de VL* de 3G8
 <400> 214
 Ser Thr Ser Asn Leu Gln Ser
 10 1 5
 <210> 215
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR2 de VL* de 3G8
 <400> 215
 Thr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 216
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de CDR2 de VL* de 3G8
 25 <400> 216
 Thr Thr Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 217
 <211> 32
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencias VL derivadas de FR3 de VL* de 3G8
 <400> 217
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 218

<211> 32

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de FR3 de VL* de 3G8

<400> 218

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

10 <210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencias VL derivadas de CDR3 de VL* de 3G8

<400> 219

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 220

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR3 de VL* de 3G8

<400> 220

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

25 <210> 221

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencias VL derivadas de CDR3 de VL* de 3G8

<400> 221

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5
<210> 222
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencias VL derivadas de CDR3 de VL* de 3G8
<400> 222
Gln Gln Ser Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5
10 <210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
15 <223> Secuencias VL derivadas de CDR3 de VL* de 3G8
<400> 223
Gln Gln Ser Asn Glu Thr Pro Tyr Thr
1 5
<210> 224
<211> 10
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencias VL derivadas de FR4 de VL* de 3G8
<400> 224
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
25 1 5 10
<210> 225
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<223> Secuencias VL derivadas de FR4 de VL* de 3G8
<400> 225
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10
<210> 226

<211> 714

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> H3G8VL-CB3.1VH

<400> 226

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggtgtgt ctctagggga gagggccacc	60
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac	120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct	180
ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc	240
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac	300
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag	360
gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc	420
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct	480
ggacaaggcc ttgaatggat tggatatggt gatccttcag acagtgaaac tcactacaat	540
caaattgtca aggacaaggc cacattgact gttgacaaat cctccagcac agcctacatg	600
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag agctatgggc	660
tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagttg agcccaaatc ttgt	714

<210> 227

<211> 238

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> H3G8VL-CB3.1VH

<400> 227

ES 2 733 067 T3

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala
115 120 125

Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu
165 170 175

Thr His Tyr Asn Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp
180 185 190

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
195 200 205

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln
210 215 220

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235

<210> 228

<211> 732

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CB3.1VL-h3G8VH

<400> 228

gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcgggta acattggaca accagcctcc	60
atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg	120
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaactct atctgggtgtc taaactggac	180
tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtag acattttccg	300
ctcacgttgc gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc	360
caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc ccacacagac cctcacactg	420
acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt	480
cagcctcccg ggaaggctct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc	540
tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta	600
gtcctcacia tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata	660
aaccccgctt ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtgag ctcatccaac	720
aggggagagt gt	732

<210> 229

5 <211> 244

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CB3.1VL-h3G8VH

10 <400> 229

ES 2 733 067 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg
145 150 155 160

Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp
165 170 175

Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser
180 185 190

Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp
195 200 205

Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp
210 215 220

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Asn
225 230 235 240

Arg Gly Glu Cys

<210> 230

<211> 702

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 8B5-CB3.1-VEPKSC

<400> 230

gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgccg cgctgggaga aagagtcagt	60
ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca	120
gatggaacta ttaaaccgct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa	180
aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct	240
gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcgggtgt	300
gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gagggccaggt ccaactgcag	360
cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct	420
ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt	480
gaatggattg gtatggttga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag	540
gacaaggcca cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc	600
ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta ctgggggtcaa	660
ggaacctcag tcaccgtctc ctgagttgag cccaaatctt gt	702

5 <210> 231

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> 8B5-CB3.1-VEPKSC

<400> 231

ES 2 733 067 T3

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
165 170 175

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
210 215 220

Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230

<210> 232

<211> 726

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CB3.1-8B5-FNRGEC

<400> 232

gatgttgtga tgaccacagac tccactcact ttgtcgggta acattggaca accagcctcc	60
atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg	120
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaactct atctgggtgtc taaactggac	180
tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtag acattttccg	300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc	360
gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc	420
tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct	480
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca	540
tactatgctg agtctgtgat agggagggtc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt	600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct	660
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgtt caacagggga	720
gagtgt	726

<210> 233

<211> 242

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CB3.1-8B5-FNRGEC

<400> 233

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

10

ES 2 733 067 T3

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Glu Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser
145 150 155 160

Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Phe Asn Arg Gly
225 230 235 240

Glu Cys

<210> 234

<211> 696

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC

<400> 234

gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgagg cgctgggaga aagagtcagt	60
ctcacttggtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctgggttca gcagaaacca	120
gatggaacta ttaaaccgct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa	180
aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct	240
gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcgggtgct	300

ES 2 733 067 T3

gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt ccaactgcag 360
 cagcctgggg ctgagctggg gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct 420
 ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt 480
 gaatggattg gtatgggtga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540
 gacaaggcca cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc 600
 ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta ctgggggtcaa 660
 ggaacctcag tcaccgtctc ctactggga ggctgc 696

<210> 235

<211> 232

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC

<400> 235

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
 115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 145 150 155 160

ES 2 733 067 T3

Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
165 170 175

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230

<210> 236

<211> 720

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CB3.1-8B5-LGGC

<400> 236

gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc	60
atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg	120
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaactct atctgggtgtc taaactggac	180
tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtag acattttccg	300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc	360
gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc	420
tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct	480
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca	540
tactatgctg agtctgtgat agggagggtc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt	600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct	660
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc	720

10 <210> 237

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CB3.1-8B5-LGGC

<400> 237

ES 2 733 067 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Glu Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser
145 150 155 160

Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230 235 240

<210> 238

<211> 47

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador Lgh628F

<400> 238
 ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtc caactgcagc agcctgg 47
 <210> 239
 <211> 49
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh629R
 <400> 239
 10 ttgaattct aacaagattt gggctcaact gaggagacgg tgactgagg 49
 <210> 240
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador Lgh630R
 <400> 240
 gcctccgcct ccggatccgc ctctttcag ctccagcttg gtccc 45
 <210> 241
 20 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh631F
 25 <400> 241
 ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg aagcttgagg agtctgg 47
 <210> 242
 <211> 49
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh640R
 <400> 242
 ttgaattct aacactctcc cctgttgaac gaggagactg tgagagtgg 49
 35 <210> 243
 <211> 48

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh644R
 5 <400> 243
 ttgtcgtca tcatcgtctt ttagtcgga gtggacacct gtggagag 48
 <210> 244
 <211> 42
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh646R
 <400> 244
 ttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgactg ag 42
 15 <210> 245
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador Lgh647F
 <400> 245
 caaagacgat gatgacgaca aagacattca gatgacacag tctcc 45
 <210> 246
 <211> 43
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh648R
 <400> 246
 30 ttgaattct agcagcctcc cagcgaggag actgtgagag tgg 43
 <210> 247
 <211> 1044
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> 2.4G2-3G8-hKappa

<400> 247

gatgtccaga tgacccagtc tccatctaata cttgctgcct ctccctggaga aagtgtttcc	60
atcaattgca aggcaagtga gagcattagc aagtatttag cctggatatct acagaaacct	120
gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat gggccaactt tgcaatctgg aattccatcg	180
aggttcagtg gcagtggatc tggtagacat ttactcttca ccatcagaag cctggagcct	240
gaagattttg gactctatta ctgtcaacag cattatgaat atccagccac gttcggttct	300
gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt taccctgaaa	360
gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc cagaccctca gtctgacttg ttctttctct	420
gggttttcac tgaggacttc tggtaggggt gtaggctgga ttctgcagcc ttcagggaag	480
ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgtataa tccagccctg	540
aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc	600
agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt	660
gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtgagctcac tgggaggctg cggcggaggg	720
agccgtacgg tggctgcacc atcggctctc atcttccgc catctgatga gcagttgaaa	780
tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta	840
cagtgaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag	900
gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa agcagactac	960
gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca	1020
aagagcttca acaggggaga gtgt	1044

<210> 248

5 <211> 348

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2.4G2-3G8-hKappa

10 <400> 248

ES 2 733 067 T3

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

ES 2 733 067 T3

100	105	110
Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln		
115	120	125
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu		
130	135	140
Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys		
145	150	155
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr		
165	170	175
Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser		
180	185	190
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala		
195	200	205
Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly		
210	215	220
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly		
225	230	235
Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
245	250	255
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
260	265	270
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
275	280	285
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
290	295	300
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
305	310	315
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
325	330	335
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
340	345	

<210> 249

<211> 1734

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3G8-2.4G2-hG1

<400> 249

gacactgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc	60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac	120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct	180
gggatcccag ccagggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	240
cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac	300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag	360
gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggctcct gaaactctcg	420
tgtgcagcct caggattcac tttcagtac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca	480
acgacgggtc tggagtgggt cgcattccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga	540
gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg	600
caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg	660
ggaataccta cagggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca	720
ctgggaggct gcggcggagg gagcgcctcc accaagggcc catcggtctt cccctggca	780
ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac	840
ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc	900
ttccccgctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc	960
tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc	1020
aagggtggaca agagagttga gcccaaactc tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	1080
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac	1140
accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa	1200
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	1260
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	1320
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca	1380
gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac	1440
accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc	1500
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac	1560
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag	1620
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat	1680
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa	1734

5 <210> 250

<211> 578

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 733 067 T3

<223> 3G8-2.4G2-hG1

<400> 250

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
165 170 175

Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
180 185 190

ES 2 733 067 T3

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu
 195 200 205
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
 210 215 220
 Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 245 250 255
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 260 265 270
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 275 280 285
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 290 295 300
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 305 310 315 320
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 325 330 335
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 340 345 350
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 355 360 365
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 370 375 380
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 385 390 395 400
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 405 410 415
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 420 425 430
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 435 440 445

ES 2 733 067 T3

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
450 455 460

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
465 470 475 480

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
485 490 495

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
500 505 510

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
515 520 525

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
530 535 540

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
545 550 555 560

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
565 570 575

Gly Lys

<210> 251

<211> 720

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CD79VL-CD32BVH

<400> 251

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc	60
atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg	120
tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgctaattt atctgggtgtc taaactggac	180
tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
agcaggggtgg aggctgagga tggtgggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg	300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc	360
gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc	420
tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gagccttga tggactgggt ccgtcagtct	480
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca	540
tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt	600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct	660
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc	720

10

<210> 252

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> CD79VL-CD32BVH

<400> 252

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile

ES 2 733 067 T3

180

185

190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230 235 240

<210> 253

<211> 696

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CD32BVL-CD79VH-1

<400> 253

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc	60
atcacttgctc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca	120
ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcctccactt tagattctgg tgtcccatcc	180
aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct	240
gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcggaggg	300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg	360
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct	420
ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggccctgg acaagggtt	480
gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag	540
gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc	600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa	660
gggaccacgg tcaccgtctc ctactggga ggctgc	696

10 <210> 254

<211> 232

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CD32BVL-CD79VH-1

<400> 254

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

ES 2 733 067 T3

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
165 170 175

Gln Met Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230

<210> 255

<211> 696

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CD32BVL-CD79VH-2

<400> 255

ES 2 733 067 T3

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc 60
atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca 120
ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc 180
aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240
gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcggaggg 300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360
cagtcctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420
ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccttg acaagggctt 480
gagtggtatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag 540
gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660
gggaccacgg tcaccgtctc ctcaactggga ggctgc 696

<210> 256

<211> 232

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CD32BVL-CD79VH-2

<400> 256

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 733 067 T3

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
165 170 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230

<210> 257

<211> 720

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC

<400> 257

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaaca gccggcctcc	60
atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg	120
tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac	180
tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagc gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
agcaggggtgg aggctgagga tggtgggggtt tattactgct ggcaagggtac acattttccg	300
ctcacgttcg gcggaggggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc	360
gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc	420
tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct	480
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca	540
tactatgctg agtctgtgat agggagggtc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt	600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct	660
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc	720

<210> 258

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC

<400> 258

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230 235 240

<210> 259

<211> 696

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> H8B5VL-hHBCRCVH M48I-LGGC

<400> 259

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc      60
atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca      120
ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattcttg tgtcccatcc      180
aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct      240
gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcggaggg      300
gggaccaagg tggaataaaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg      360
cagtctggag ctgagggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct      420
ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccttg acaagggtt      480
gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag      540
gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc      600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa      660
gggaccacgg tcaccgtctc ctactggga ggctgc      696

```

<210> 260

<211> 232

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> H8B5VL-HBCRCVH M48I-LGGC

<400> 260

```

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

```

```

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

```

15

ES 2 733 067 T3

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

<210> 261

<211> 36

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador Lgh321F

<400> 261

cgagctagct ctgatgaga tcacagtct ctctac 36

10 <210> 262

<211> 45

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh386R
 5 <400> 262
 ttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tggtc 45
 <210> 263
 <211> 39
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh784F
 <400> 263
 ggcggatccg gaggcggagg ccagggtcag ctggtgcag 39
 15 <210> 264
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador Lgh785R
 <400> 264
 cctccggatc cgcctcctt gatctcaagc ttgtccc 38
 <210> 265
 <211> 42
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Lgh786R
 <400> 265
 30 ttgaattct agcagcctcc caggctggag acggtcacca gg 42
 <210> 266
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador Lgh787F

<400> 266
 ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg cagcttggtg agtc 44
 <210> 267
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Conector
 <400> 267
 10 **Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser**
 1 5
 <210> 268
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Conector
 <400> 268
Leu Glu Ile Lys
 1
 <210> 269
 20 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Conector
 25 <400> 269
Thr Val Ser Ser
 1
 <210> 270
 <211> 343
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa
 <400> 270

ES 2 733 067 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
165 170 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala
225 230 235 240

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
245 250 255

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
260 265 270

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
275 280 285

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
290 295 300

ES 2 733 067 T3

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
305 310 315 320

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
325 330 335

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
340

<210> 271

<211> 1032

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa

<400> 271

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc	60
atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt gggtacttaa gctggctgca gcagaaacca	120
ggcaaggccc ctgacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc	180
aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct	240
gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcggaggg	300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg	360
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct	420
ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac agggccctgg acaagggctt	480
gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag	540
gacagagtc ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc	600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa	660
gggaccacgg tcaccgtctc ctactggga ggctgcggcg gagggagccg aactgtggct	720
gcaccatcgg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct	780
gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat	840
aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc	900
acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc	960
tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg	1020
ggagagtgtt ag	1032

10 <210> 272

<211> 574

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 733 067 T3

<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1

<400> 272

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys

ES 2 733 067 T3

225		230		235		240
Gly Gly Gly Ser Ala	Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala					
	245		250			255
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu						
	260		265			270
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly						
	275		280			285
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser						
	290		295			300
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu						
	305		310			315
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr						
	325					330
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr						
	340		345			350
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe						
	355		360			365
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro						
	370		375			380
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val						
	385		390			395
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr						
	405					410
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val						
	420		425			430
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys						
	435		440			445
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser						
	450		455			460
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro						
	465		470			475
						480

ES 2 733 067 T3

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
485 490 495

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
500 505 510

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
515 520 525

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
530 535 540

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
545 550 555 560

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565 570

<210> 273

<211> 1722

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1

<400> 273

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc	60
atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg	120
tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctgggtgtc taaactggac	180
tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
agcaggggtgg aggctgagga tggtgggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg	300
ctcacgttcg gcggaggggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc	360
gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc	420
tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt cgtcaggcc	480
ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca	540
tactatgctg agtctgtgat agggagggtc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt	600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct	660
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctccagcct gggaggctgc	720
ggcggaggga gcgcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag	780
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaaccg	840
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctcg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc	900

ES 2 733 067 T3

```

ctacagtccct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg      960
ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag      1020
agagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc cagcacctgaa      1080
ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgac      1140
tcccggaccc ctgaggtcac atgctgtgtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc      1200
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag      1260
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg      1320
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag      1380
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca      1440
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat      1500
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc      1560
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac      1620
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac      1680
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa                          1722

```

<210> 274

<211> 335

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa

<400> 274

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

ES 2 733 067 T3

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

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
165 170 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
210 215 220

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
225 230 235 240

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
245 250 255

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
260 265 270

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
275 280 285

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
290 295 300

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
305 310 315 320

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330 335

<210> 275

<211> 1005

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa

<400> 275

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc	60
atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca	120
ggcaaggccc ctgacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc	180
aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct	240
gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcggaggg	300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg	360
cagctctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtgagggtctctg caaggcttct	420
ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac agggccctgg acaagggctt	480
gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag	540
gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc	600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa	660
gggaccacgg tcctggagat caagcgaact gtggctgcac catcggtctt catcttcccg	720
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctggtg tgtgcctgct gaataacttc	780
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	840
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctcg	900
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	960
ggcctgagct cggccgctcac aaagagcttc aacaggggag agtgt	1005

<210> 276

<211> 566

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1 = HBCRCVL R45N-h8B5VH_-hG1

<400> 276

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly	
1 5 10 15	
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser	
20 25 30	
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	

10

ES 2 733 067 T3

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
 145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
 165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
 210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 245 250 255

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 260 265 270

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 275 280 285

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 290 295 300

ES 2 733 067 T3

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
305 310 315 320

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
325 330 335

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
340 345 350

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
355 360 365

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
370 375 380

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
385 390 395 400

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
405 410 415

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
420 425 430

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
435 440 445

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
450 455 460

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
465 470 475 480

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
485 490 495

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
500 505 510

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
515 520 525

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
530 535 540

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
545 550 555 560

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565

<210> 277

<211> 1698

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1

<400> 277

gatgttgtga tgactcagtc tocactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc	60
atctcctgca agtcaagtca gaggctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg	120
tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctgggtgtc taaactggac	180
tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
agcaggggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg	300
ctcacgttcg gcggaggggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcgagggc	360
gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc	420
tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc	480
ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca	540
tactatgctg agtctgtgat agggagggtc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt	600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct	660
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctccagcgc ctccaccaag	720
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc	780
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgcgtg gaactcaggc	840
gccctgacca gcggcgtgca cacttccccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	900
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac	960
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac	1020
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc	1080
ctcttcccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	1140
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtg cgtggacggc	1200
gtggaggtgc ataattgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	1260
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1320
aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcca agccaaaggg	1380
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	1440
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg	1500
gagagcaatg ggagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac	1560
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggca gcagggaac	1620
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1680
tcctgtctc cgggtaaa	1698

<210> 278

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Conector
 <400> 278
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 5 <210> 279
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Conector
 <400> 279
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met
 1 5 10
 <210> 280
 <211> 6
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Conector
 <400> 280
 Leu Glu Gly Glu Glu Gly
 20 1 5
 <210> 281
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Conector
 <400> 281
 Leu Glu Gly Glu Glu Gly Cys
 1 5
 <210> 282
 30 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Conector

<400> 282
Leu Glu Ile Lys
1
<210> 283
<211> 5
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Conector
<400> 283
Leu Gly Glu Glu Gly
10 1 5
<210> 284
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<223> Conector
<400> 284
Leu Gly Glu Glu Gly Cys
1 5
<210> 285
20 <211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Conector
25 <400> 285
Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 286
<211> 5
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Conector
<400> 286
Leu Gly Lys Lys Gly
1 5

<210> 287
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Conector
 <400> 287
 Leu Gly Lys Lys Gly Cys
 1 5
 <210> 288
 10 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Conector
 15 <400> 288
 Leu Lys Gly Lys Lys Gly
 1 5
 <210> 289
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Conector
 <400> 289
 Leu Lys Gly Lys Lys Gly Cys
 1 5
 25 <210> 290
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Conector
 <400> 290
 Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met
 1 5
 <210> 291
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Conector
 5 <400> 291
 Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys
 1 5
 <210> 292
 <211> 4
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Conector
 <400> 292
 Thr Val Ser Ser
 1
 15 <210> 293
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Conector
 <400> 293
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 294
 <211> 14
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Conector
 <400> 294
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
 30 1 5 10
 <210> 295
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Conector
 <400> 295
 Val Gln Val His Tyr Arg Met
 1 5
 5 <210> 296
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Conector
 <400> 296
 Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys
 1 5
 <210> 297
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Conector
 <400> 297
 Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
 20 1 5
 <210> 298
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Conector
 <400> 298
 Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys
 1 5
 <210> 299
 30 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Conector de enrollamiento-E

<400> 299

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 300

<211> 28

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Conector de enrollamiento-K

<400> 300

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

10 Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 301

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Conector

<400> 301

Gly Gly Gly Asn Ser
1 5

<210> 302

20 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera de YA2B6

25 <400> 302

ES 2 733 067 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

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

<210> 303

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena pesada de YA2B6

<400> 303

ES 2 733 067 T3

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

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

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

Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 304

<211> 46

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de unión a albúmina

<400> 304

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

10 <210> 305

<211> 279

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-enrollamientoK-GGGNS

<400> 305

ES 2 733 067 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
 20 25 30
 Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
 100 105 110
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 115 120 125
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 130 135 140
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
 165 170 175
 Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
 180 185 190
 Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
 195 200 205
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
 210 215 220
 Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
 245 250 255
 Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
 260 265 270
 Lys Glu Gly Gly Gly Asn Ser
 275

<210> 306

<211> 837

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-enrollamientoK-GGGNS

<400> 306

gacatcgtga tgaccaatc tccagactct ttggtgtgt ctctagggga gagggccacc	60
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac	120
caacagaaac caggacagcc acccaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct	180
ggggtcccag acaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc	240
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga agatccgtac	300
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggcgg cggaggccag	360
gttcacgtgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc	420
tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct	480
ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat	540
aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtatgcgtat ccacgagcac agcctacatg	600
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgagag aaacggtgat	660
tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctcc	720
ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag	780
aaggtcgccc cacttaagga aaaggtcgca gccctgaaag agggcggcgg gaattct	837

10 <210> 307

<211> 318

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-enrollamientoE-GGGNS-ABD

<400> 307

ES 2 733 067 T3

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Phe	Gln	Ser	Val	Thr	Pro	Lys	1	5	10	15
Glu	Lys	Val	Thr	Phe	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	20	25	30	
Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	35	40	45	
Lys	Glu	Val	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Ala	65	70	75	80
Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	Thr	Trp	Pro	Phe	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	100	105	110	
Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	115	120	125	
Pro	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	130	135	140	
Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	145	150	155	160
Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	165	170	175	

ES 2 733 067 T3

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
180 185 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
210 215 220

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

Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
245 250 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asn Ser
260 265 270

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
275 280 285

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
290 295 300

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
305 310 315

<210> 308

<211> 954

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-enrollamientoE-GGGNS-ABD

<400> 308

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc	60
ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca	120
gatcagtcctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg	180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct	240
gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt taccctgaga	360
gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct	420
gggttttcac tgagcacttc tggatatggg gtaggetgga ttcgtcagcc tcccgggaag	480
gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgtataa tccagccctg	540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc 600
aaccatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaacc cgcctgggtt 660
gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtgagctccg gaggatgtgg cgggtggagaa 720
gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag 780
gaggtcgag ccttgagaa aggcggcggg aattctctgg ccgaagcaaa agtgctggcc 840
aaccgcgaac tggataaata tggcgtgagc gattattata agaacctgat taacaacgca 900
aagaccgtgg aaggcgtgaa agcactgatt gatgaaattc tggccgccct gcct 954

<210> 309

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Conector

<400> 309

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

10 <210> 310

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Conector

<400> 310

Val Pro Ser Met Gly Ser Ser Ser
1 5

<210> 311

<211> 383

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 311

Met Gly Leu Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ala Gly Ile Phe Pro Phe
1 5 10 15

Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu
20 25 30

Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Thr Glu
35 40 45

ES 2 733 067 T3

Val	His	Leu	Asp	Gly	Gln	Pro	Phe	Leu	Arg	Cys	Asp	Arg	Gln	Lys	Cys	50	55	60
Arg	Ala	Lys	Pro	Gln	Gly	Gln	Trp	Ala	Glu	Asp	Val	Leu	Gly	Asn	Lys	65	70	75
Thr	Trp	Asp	Arg	Glu	Thr	Arg	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	Gly	Lys	Asp	Leu	85	90	95
Arg	Met	Thr	Leu	Ala	His	Ile	Lys	Asp	Gln	Lys	Glu	Gly	Leu	His	Ser	100	105	110
Leu	Gln	Glu	Ile	Arg	Val	Cys	Glu	Ile	His	Glu	Asp	Asn	Ser	Thr	Arg	115	120	125
Ser	Ser	Gln	His	Phe	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Glu	Leu	Phe	Leu	Ser	Gln	Asn	130	135	140
Leu	Glu	Thr	Lys	Glu	Trp	Thr	Met	Pro	Gln	Ser	Ser	Arg	Ala	Gln	Thr	145	150	155
Leu	Ala	Met	Asn	Val	Arg	Asn	Phe	Leu	Lys	Glu	Asp	Ala	Met	Lys	Thr	165	170	175
Lys	Thr	His	Tyr	His	Ala	Met	His	Ala	Asp	Cys	Leu	Gln	Glu	Leu	Arg	180	185	190
Arg	Tyr	Leu	Lys	Ser	Gly	Val	Val	Leu	Arg	Arg	Thr	Val	Pro	Pro	Met	195	200	205
Val	Asn	Val	Thr	Arg	Ser	Glu	Ala	Ser	Glu	Gly	Asn	Ile	Thr	Val	Thr	210	215	220
Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Phe	Tyr	Pro	Trp	Asn	Ile	Thr	Leu	Ser	Trp	Arg	225	230	235
Gln	Asp	Gly	Val	Ser	Leu	Ser	His	Asp	Thr	Gln	Gln	Trp	Gly	Asp	Val	245	250	255
Leu	Pro	Asp	Gly	Asn	Gly	Thr	Tyr	Gln	Thr	Trp	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	260	265	270
Cys	Gln	Gly	Glu	Glu	Gln	Arg	Phe	Thr	Cys	Tyr	Met	Glu	His	Ser	Gly	275	280	285
Asn	His	Ser	Thr	His	Pro	Val	Pro	Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Val	Leu	Gln	290	295	300

ES 2 733 067 T3

Ser His Trp Gln Thr Phe His Val Ser Ala Val Ala Ala Ala Ala Ile
305 310 315 320

Phe Val Ile Ile Ile Phe Tyr Val Arg Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser
325 330 335

Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His
340 345 350

Pro Val Gly Thr Ser Asp His Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln
355 360 365

Pro Leu Met Ser Asp Leu Gly Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala
370 375 380

<210> 312

<211> 305

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 312

Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Met Val Leu Ser Gln Asp Gly Ser
1 5 10 15

Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu Gly His Leu Asp Gly Gln Pro Phe
20 25 30

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

Ala Glu Asp Val Leu Gly Ala Lys Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu Asp
50 55 60

Leu Thr Glu Asn Gly Gln Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His Ile Lys
65 70 75 80

Asp Gln Lys Gly Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu
85 90 95

Ile His Glu Asp Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr Asp
100 105 110

Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr Val
115 120 125

Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Thr Asn Phe
130 135 140

ES 2 733 067 T3

Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala Met Gln
145 150 155 160

Ala Asp Cys Leu Gln Lys Leu Gln Leu Pro Pro Met Val Asn Val Ile
165 170 175

Cys Ser Glu Val Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser
180 185 190

Ser Phe Tyr Pro Arg Asn Ile Thr Leu Thr Trp Arg Gln Asp Gly Val
195 200 205

Ser Leu Ser His Asn Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly
210 215 220

Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Arg Gln Gly Glu
225 230 235 240

Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Gly Thr
245 250 255

His Pro Val Pro Ser Gly Lys Ala Leu Val Leu Gln Ser Gln Arg Thr
260 265 270

Asp Phe Pro Tyr Val Ser Ala Ala Met Pro Cys Phe Val Ile Ile Ile
275 280 285

Ile Leu Cys Val Pro Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser Ala Ala Glu Gly
290 295 300

Pro
305

<210> 313

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Conector

<400> 313

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

10 <210> 314

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Conector

<400> 314

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 315

<211> 241

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TCRVL-HER2VH

<400> 315

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
115 120 125

Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
130 135 140

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
145 150 155 160

10 Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro
165 170 175

ES 2 733 067 T3

Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
180 185 190

Ala Tyr Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
195 200 205

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
210 215 220

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg Gly Glu
225 230 235 240

Cys

<210> 316

<211> 723

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> TCRVL-HER2VH

<400> 316

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gtgccacctc aagtgttaagt tacatgcact ggatcagca gaaaccaggg	120
aaagccccta agcgttgat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggc cccatcaagg	180
ttcagcggca gtggatctgg gacagaatct actctcaca tcagcagcct gcagcctgaa	240
gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg	300
accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag	360
tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcaactcaagt tgcctgtac agcttctggc	420
ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggccatgaaca gggcctggaa	480
tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac	540
aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg	600
acatctgagg aactgcccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct	660
atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct ccggattcaa caggggagag	720
tgt	723

10 <210> 317

<211> 242

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> HER2VL-TCRVH

<400> 317

ES 2 733 067 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn
165 170 175

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
195 200 205

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr
210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Val Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Cys

<210> 318

<211> 726

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HER2VL-TCRVH

<400> 318

gacatcgtga tgaccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc	60
atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca	120
ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat	180
cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct	240
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctccac cttcggaggg	300
ggtagccaagg tggagatcaa aggaggcggg tccggcggcg gaggccaggt tcagctgggtg	360
cagtctggag ctgagggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc	420
ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccttg acaaggcctt	480
gagtggatcg gatattataa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa	540
ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc	600
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac	660
gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagt tgagcccaa	720
tcttgt	726

<210> 319

5 <211> 273

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TCRVL-HER2VH-enrollamientoE

10 <400> 319

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met	
20 25 30	
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr	
35 40 45	

ES 2 733 067 T3

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
115 120 125

Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
130 135 140

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
145 150 155 160

Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro
165 170 175

Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
180 185 190

Ala Tyr Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
195 200 205

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
210 215 220

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
225 230 235 240

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
245 250 255

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asn
260 265 270

Ser

<210> 320

<211> 819

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> TCRVL-HER2VH-enrollamientoE

<400> 320

ES 2 733 067 T3

Gly Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys Ala Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr
 20 25 30
 Gly Thr Cys Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly
 35 40 45
 Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Thr
 50 55 60
 Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Thr Cys
 65 70 75 80
 Ala Ala Gly Thr Gly Thr Ala Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Thr Gly
 85 90 95
 Cys Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala
 100 105 110
 Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Cys
 115 120 125
 Thr Ala Ala Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Ala Thr
 130 135 140
 Gly Ala Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly
 145 150 155 160
 Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Ala Thr Cys
 165 170 175
 Ala Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Thr
 180 185 190
 Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala Ala Thr
 195 200 205
 Thr Thr Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Gly
 210 215 220

ES 2 733 067 T3

Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala
 225 230 235 240
 Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr
 245 250 255
 Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Gly
 260 265 270
 Thr Ala Gly Thr Ala Ala Cys Cys Cys Gly Cys Thr Cys Ala Cys Gly
 275 280 285
 Thr Thr Thr Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala
 290 295 300
 Ala Gly Cys Thr Thr Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala Ala Gly Gly
 305 310 315 320
 Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys
 325 330 335
 Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys
 340 345 350
 Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys
 355 360 365
 Ala Gly Ala Gly Cys Thr Thr Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Ala
 370 375 380
 Gly Gly Gly Gly Cys Cys Thr Cys Ala Cys Thr Cys Ala Ala Gly Thr
 385 390 395 400
 Thr Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys
 405 410 415
 Thr Gly Gly Cys Thr Thr Cys Ala Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala
 420 425 430
 Gly Ala Cys Ala Cys Cys Thr Ala Thr Ala Thr Ala Cys Ala Cys Thr
 435 440 445
 Gly Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Gly Gly Cys Cys
 450 455 460
 Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala
 465 470 475 480

ES 2 733 067 T3

Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Ala Ala Gly Gly Ala Thr Thr Thr
 485 490 495
 Ala Thr Cys Cys Thr Ala Cys Gly Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala
 500 505 510
 Thr Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys Gly
 515 520 525
 Ala Ala Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Gly
 530 535 540
 Cys Cys Ala Cys Thr Ala Thr Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala
 545 550 555 560
 Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Cys Ala
 565 570 575
 Gly Cys Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala
 580 585 590
 Gly Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala
 595 600 605
 Gly Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Gly Thr Cys Thr Ala Thr
 610 615 620
 Thr Ala Thr Thr Gly Thr Thr Cys Thr Ala Gly Ala Thr Gly Gly Gly
 625 630 635 640
 Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Ala
 645 650 655
 Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly
 660 665 670
 Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Cys Gly Gly
 675 680 685
 Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly Ala Gly Cys Thr Cys Cys Gly Gly
 690 695 700
 Ala Gly Gly Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala
 705 710 715 720
 Gly Ala Ala Gly Thr Gly Gly Cys Cys Gly Cys Ala Cys Thr Gly Gly
 725 730 735

ES 2 733 067 T3

Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Thr Thr Gly Cys Thr Gly Cys
740 745 750

Thr Thr Thr Gly Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Thr Cys
755 760 765

Gly Cys Thr Gly Cys Ala Cys Thr Thr Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly
770 775 780

Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala
785 790 795 800

Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ala Ala Thr
805 810 815

Thr Cys Thr

<210> 321

<211> 274

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HER2VL-TCRVH-enrollamientok

<400> 321

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

ES 2 733 067 T3

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn
165 170 175

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
195 200 205

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr
210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Gly Gly Gly
260 265 270

Asn Ser

<210> 322

<211> 822

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HER2VL-TCRVH-enrollamientoK

<400> 322

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc	60
atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca	120
ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtcctgat	180
cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct	240
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg	300

ES 2 733 067 T3

ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg	360
cagtctggag ctgagggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc	420
ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccttg acaagggtt	480
gagtggatcg gatataattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa	540
ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc	600
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac	660
gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagg atgtggcggg	720
ggaaaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt	780
aaggaaaagg tcgcagccct gaaagagggc ggcgggaatt ct	822

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de diacuerpo que comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, estando las cadenas polipeptídicas unidas covalentemente entre sí, en la que:

I. la primera cadena polipeptídica comprende, en la dirección del extremo N al extremo C:

5 (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un epítipo (1),

(ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un epítipo (2), y

10 (iii) un dominio polipeptídico cargado positiva o negativamente que asume espontáneamente una conformación helicoide, en la que el dominio polipeptídico cargado positivamente es un separador de enrollamiento-E que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 299 y el dominio polipeptídico cargado negativamente es un separador de enrollamiento-K que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 300;

estando dicho primer dominio y segundo dominio unidos covalentemente de modo que el primer dominio y el segundo dominio no se asocian juntos para formar un sitio de unión a epítipo (1) o un sitio de unión a epítipo (2);

15 II. la segunda cadena polipeptídica comprende, en la dirección del extremo N al extremo C:

(i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2) específica para el epítipo (2),

(ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) específica para el epítipo (1);

20 (iii) un dominio polipeptídico cargado positiva o negativamente que asume espontáneamente una conformación helicoide unido al quinto dominio, en la que el dominio polipeptídico cargado positivamente es un separador de enrollamiento-E que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 299 y el dominio polipeptídico cargado negativamente es un separador de enrollamiento-K que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 300, en la que, cuando la primera cadena polipeptídica comprende el separador de enrollamiento-E, la segunda cadena polipeptídica comprende el separador de enrollamiento-K, o cuando la primera cadena polipeptídica comprende el separador de enrollamiento-K, la segunda cadena polipeptídica comprende el separador de enrollamiento-E;

estando dicho cuarto dominio y quinto dominio unidos covalentemente de modo que el cuarto dominio y el quinto dominio no se asocian juntos para formar el sitio de unión a epítipo (1) o el sitio de unión a epítipo (2);

30 en la que el primer dominio y el quinto dominio se asocian juntos para formar un sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al epítipo (1);

en la que el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian juntos para formar un sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al epítipo (2).

35 2. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que la primera cadena polipeptídica comprende adicionalmente un tercer dominio, en la que el tercer dominio es un dominio Fc, y en la que el tercer dominio está unido al dominio polipeptídico cargado, o el tercer dominio está unido al extremo N del primer dominio.

3. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1 o 2, en la que la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente un sexto dominio, en la que el sexto dominio es un dominio Fc, y en la que el sexto dominio está unido al dominio polipeptídico cargado, o el sexto dominio está unido al extremo N del cuarto dominio.

40 4. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1 o 2, en la que la molécula de diacuerpo comprende adicionalmente una tercera cadena polipeptídica y una cuarta cadena polipeptídica, estando la tercera y cuarta cadena polipeptídica unidas covalentemente entre sí, en la que:

III. la tercera cadena polipeptídica comprende, en la dirección del extremo N al extremo C:

(i) un séptimo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una tercera inmunoglobulina (VL3) específica para un epítipo (3),

45 (ii) un octavo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una cuarta inmunoglobulina (VH4) específica para un epítipo (4),

(iii) un dominio polipeptídico cargado positiva o negativamente que asume espontáneamente una conformación helicoide, en la que el dominio polipeptídico cargado positivamente es un separador de enrollamiento-E que tiene la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 299 y el dominio polipeptídico cargado negativamente es un separador de enrollamiento-K que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 300, y

(iv) un noveno dominio, en la que el noveno dominio es un dominio Fc;

5 estando dicho séptimo dominio y octavo dominio unidos covalentemente de modo que el séptimo dominio y el octavo dominio no se asocian juntos para formar un sitio de unión a epítipo (3) o un sitio de unión a epítipo (4);

IV. la cuarta cadena polipeptídica comprende, en la dirección del extremo N al extremo C:

(i) un décimo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la cuarta inmunoglobulina (VL4) específica para el epítipo (4),

10 (ii) un undécimo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la tercera inmunoglobulina (VH3) específica para el epítipo (3);

(iii) un dominio polipeptídico cargado positiva o negativamente que asume espontáneamente una conformación helicoidal unido al undécimo dominio, en la que el dominio polipeptídico cargado positivamente es un separador de enrollamiento-E que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 299 y el dominio polipeptídico cargado negativamente es un separador de enrollamiento-K que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 300, en la que, cuando la tercera cadena polipeptídica comprende el separador de enrollamiento-E, la cuarta cadena polipeptídica comprende el separador de enrollamiento-K, o cuando la tercera cadena polipeptídica comprende el separador de enrollamiento-K, la cuarta cadena polipeptídica comprende el separador de enrollamiento-E;

estando dicho décimo dominio y undécimo dominio unidos covalentemente de modo que el décimo dominio y el undécimo dominio no se asocian juntos para formar el sitio de unión a epítipo (3) o el sitio de unión a epítipo (4);

20 en la que el séptimo dominio y el undécimo dominio se asocian juntos para formar un sitio de unión (VL3)(VH3) que se une al epítipo (3);

en la que el octavo dominio y el décimo dominio se asocian juntos para formar un sitio de unión (VL4)(VH4) que se une al epítipo (4).

25 5. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que la primera cadena polipeptídica comprende adicionalmente:

(iv) una parte polipeptídica de una proteína que se une a una proteína sérica, pudiendo la parte polipeptídica unirse a la proteína sérica.

6. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 5, en la que la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente:

30 (iv) una parte polipeptídica de una proteína que se une a una proteína sérica, pudiendo la parte polipeptídica unirse a la proteína sérica.

7. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 5 o 6, en la que la proteína que se une a una proteína sérica es una proteína de unión a albúmina.

35 8. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 7, en la que la proteína de unión a albúmina es la proteína G de estreptococos y la parte polipeptídica es un dominio de unión a albúmina (ABD) de la proteína G de estreptococos.

9. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 8, en la que el dominio de unión a albúmina (ABD) de la proteína G de estreptococos es el dominio 3 de unión a albúmina (ABD3) de la proteína G de *Streptococcus cepa* G148.

10. La molécula de diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que tiene un dominio que se une a un epítipo de CD16.

40 11. La molécula de diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que tiene un dominio de unión al receptor de linfocitos T (TCR).

12. La molécula de diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que tiene un dominio que se une a un epítipo de CD79b y un dominio que se une a un epítipo de CD32B.

45 13. La molécula de diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la molécula de diacuerpo se une a un antígeno asociado a tumor.

14. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 13, en la que antígeno asociado a tumor es un antígeno de cáncer de mama, un antígeno de cáncer de ovario, un antígeno de cáncer de próstata, un antígeno de cáncer cervicouterino, un antígeno de carcinoma pancreático, un antígeno de cáncer pulmonar, un antígeno de cáncer de

vejiga, un antígeno de cáncer de colon, un antígeno de cáncer testicular, un antígeno de cáncer de glioblastoma, un antígeno asociado con una neoplasia de linfocitos B, un antígeno asociado con mieloma múltiple, un antígeno asociado con linfoma no hodgkiniano o un antígeno asociado con leucemia linfocítica crónica.

- 5 15. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 13, en la que el antígeno asociado a tumor es A33; ADAM-9; ALCAM; B1; BAGE; beta-catenina; CA125; carboxipeptidasa M; CD5; CD19; CD20; CD22; CD23; CD25; CD27; CD28; CD32B; CD36; CD40; CD45; CD46; CD56; CD79a; CD79b; CD103; CD154; CDK4; CEA; CTLA4; citoqueratina 8; EGF-R; un receptor de efrina; ErbB1; ErbB3; ErbB4; GAGE-1; GAGE-2; GD2; GD3; GM2; gp100; HER-2/neu; E6 de papilomavirus humano; E7 de papilomavirus humano; integrina alfa-V-beta-6; JAM-3; KID3; KID31; KSA (17-1A); LUCA-2; MAGE-1; MAGE-3; MART; MUC-1; MUM-1; N-acetilglucosaminiltransferasa; 10 oncostatina M (receptor beta de oncostatina); p15; PIPA; PSA; PSMA; RAAG10; ROR1; SART; sTn; TES7; el receptor de TNF- α ; el receptor de TNF- β ; el receptor de TNF- γ ; el receptor de transferrina o el receptor VEGF.

16. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 15, en la que el antígeno asociado a tumor es HER-2/neu.

17. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[illegible]

FIG. 1A

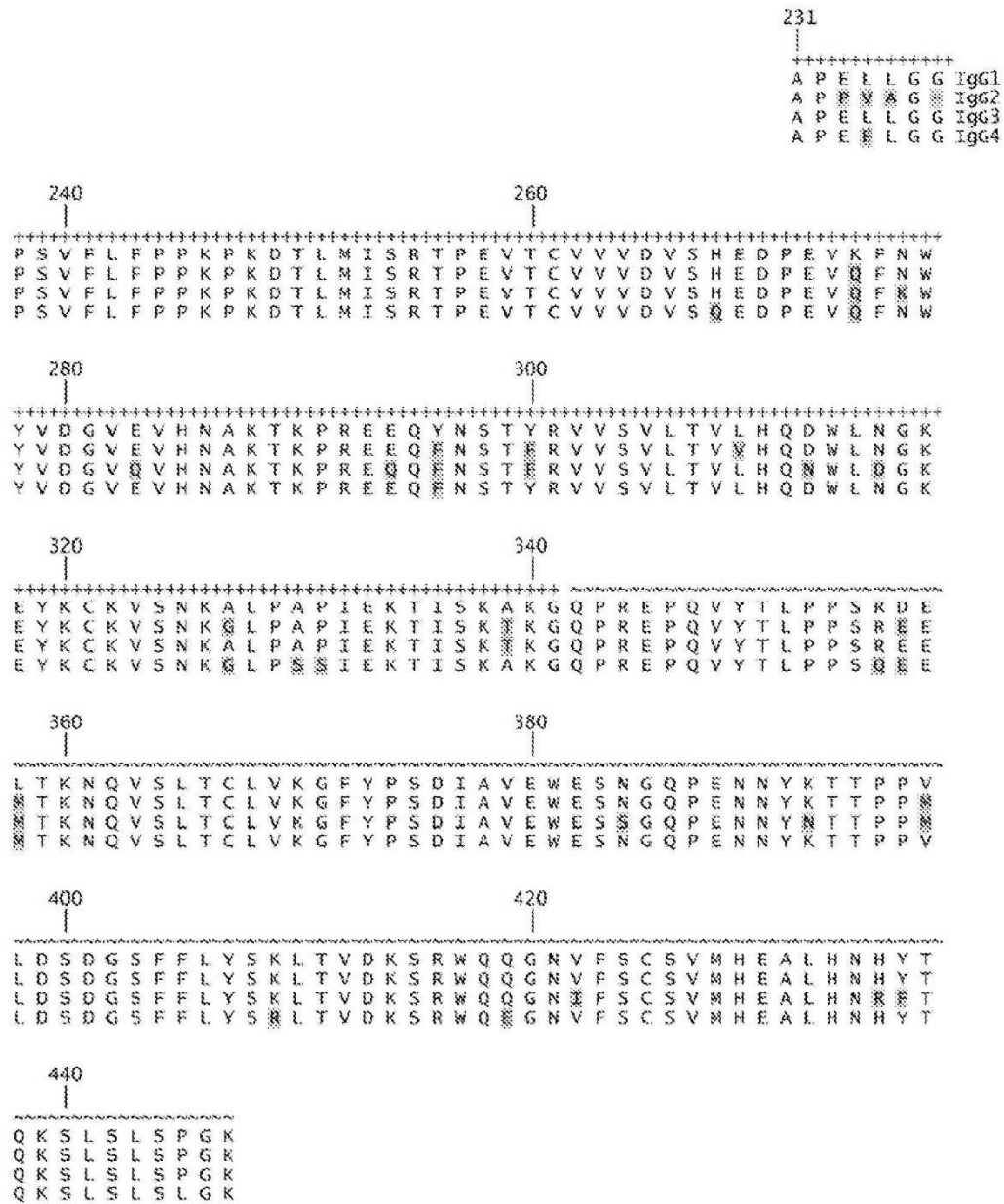


FIG. 1B

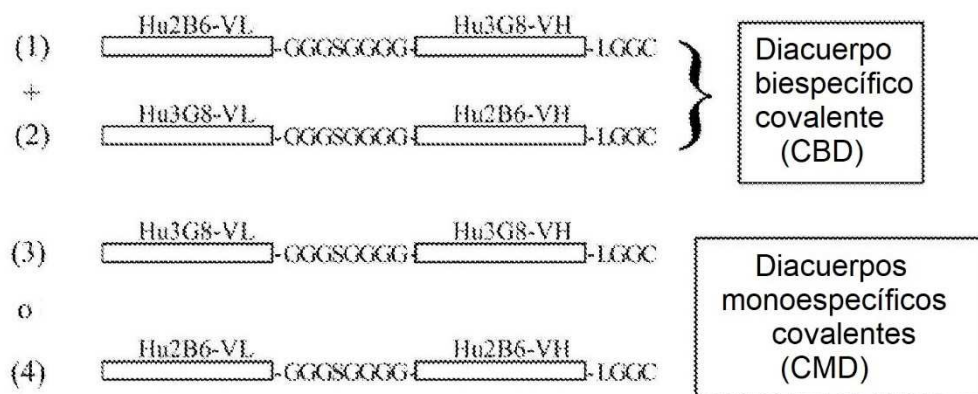


FIG. 2



FIG. 3

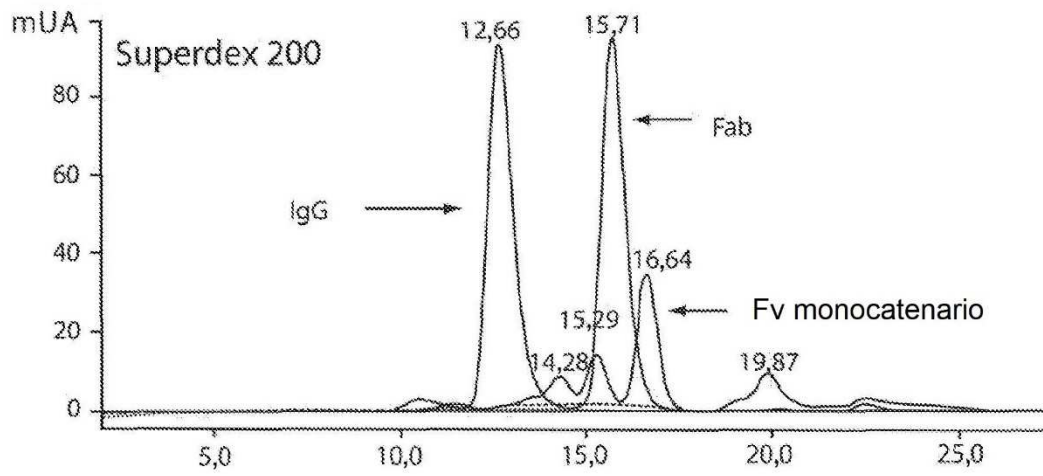


FIG. 4A

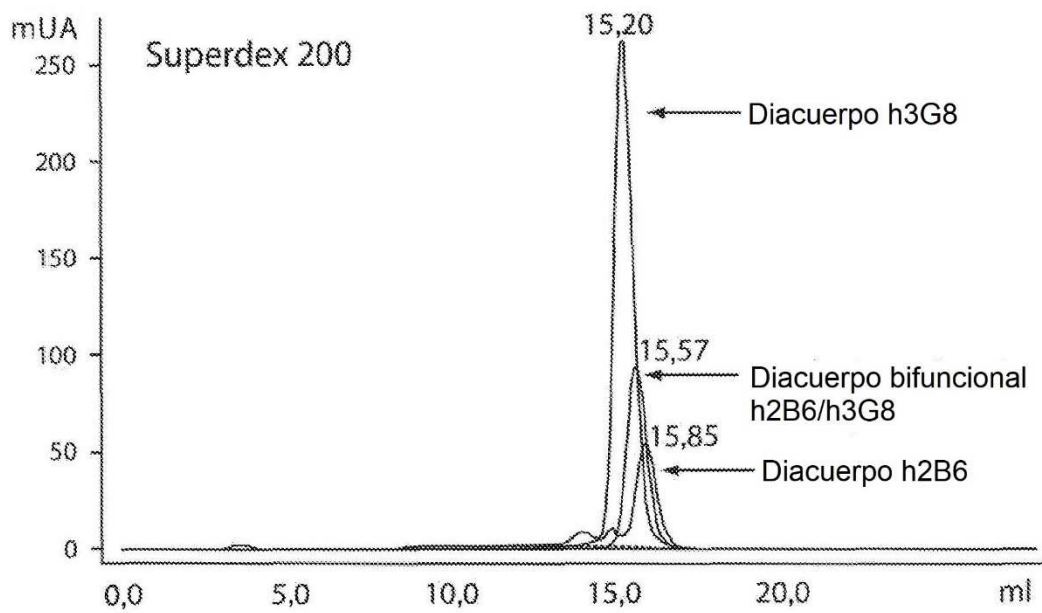


FIG. 4B

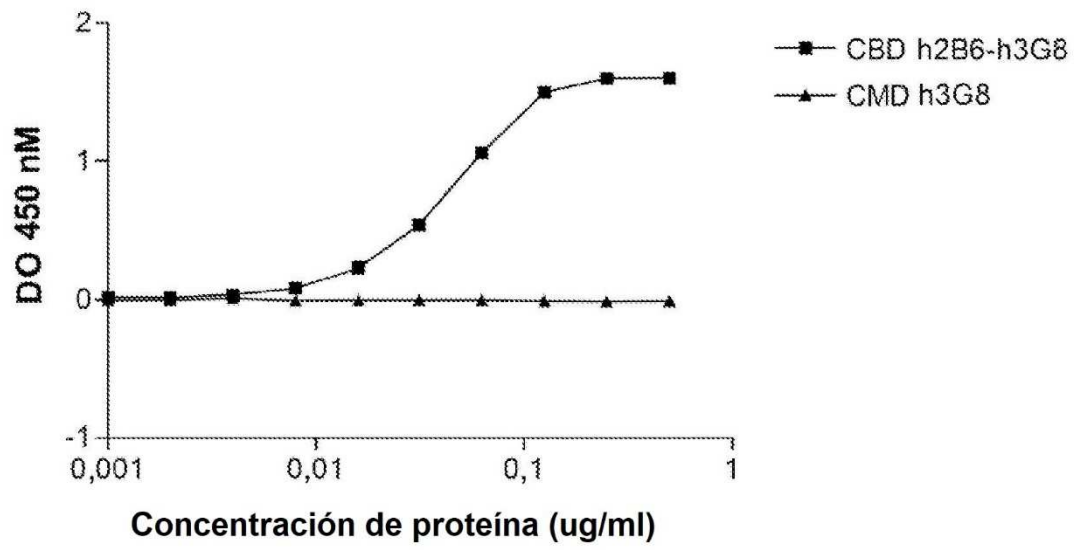


FIG. 5

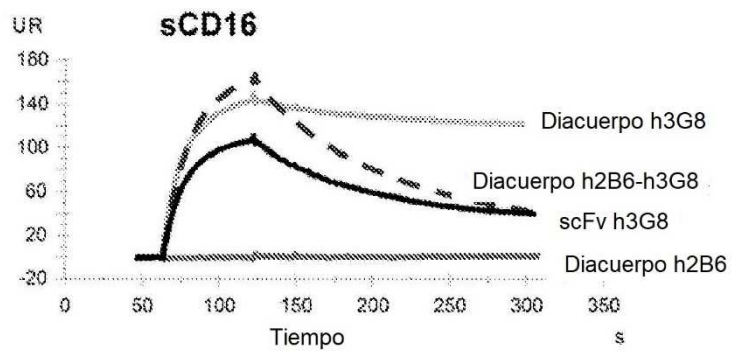


FIG. 6A

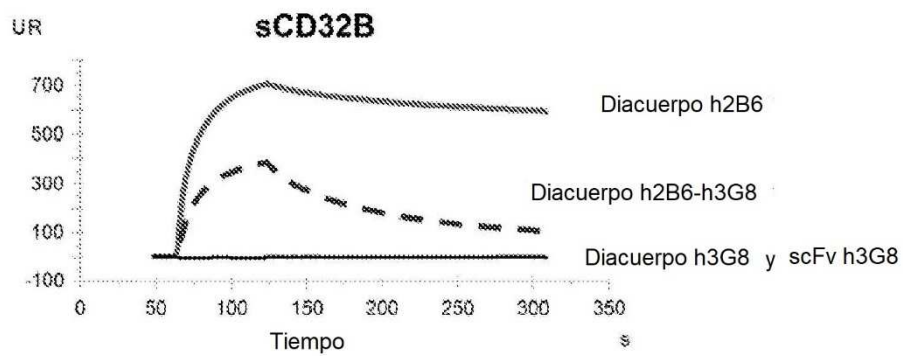


FIG. 6B

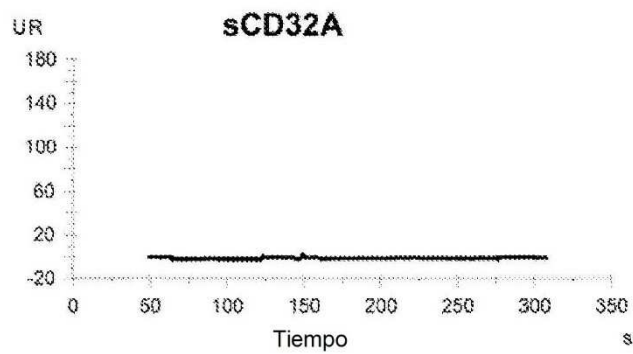
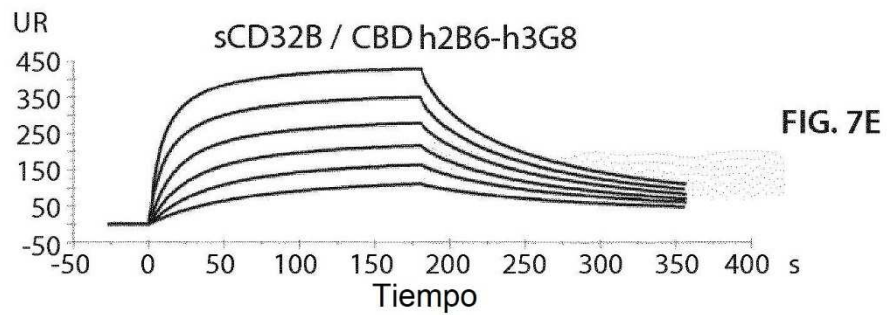
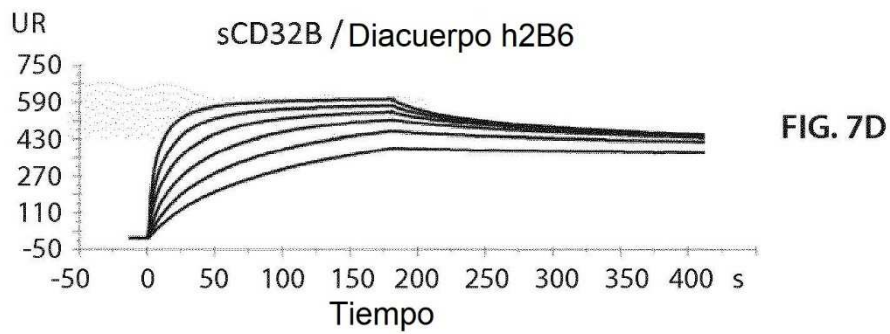
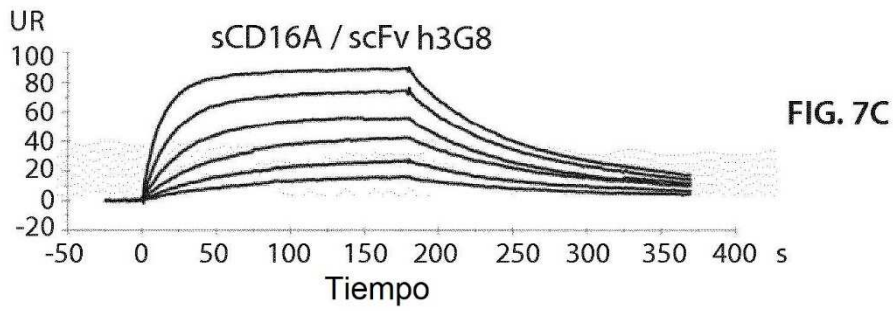
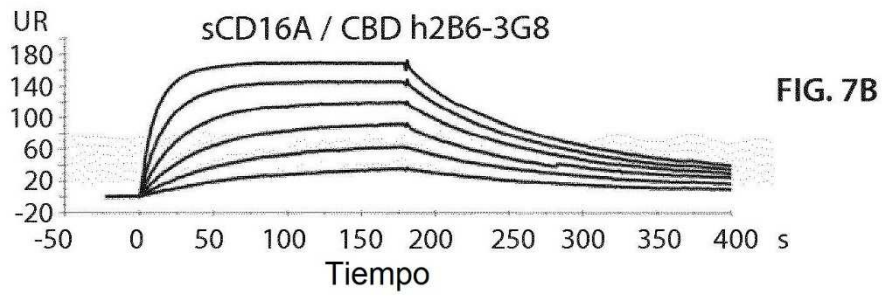
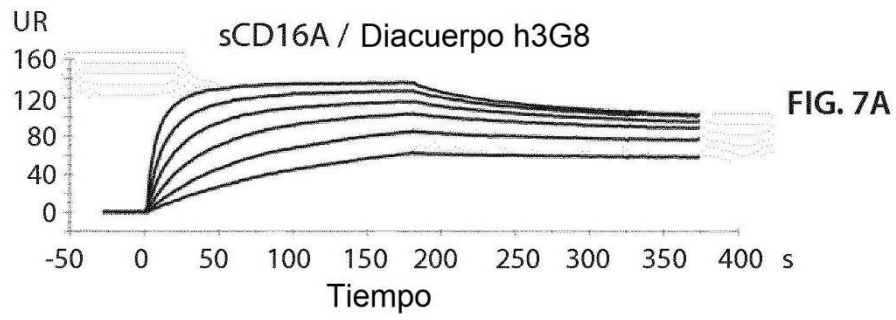


FIG. 6C



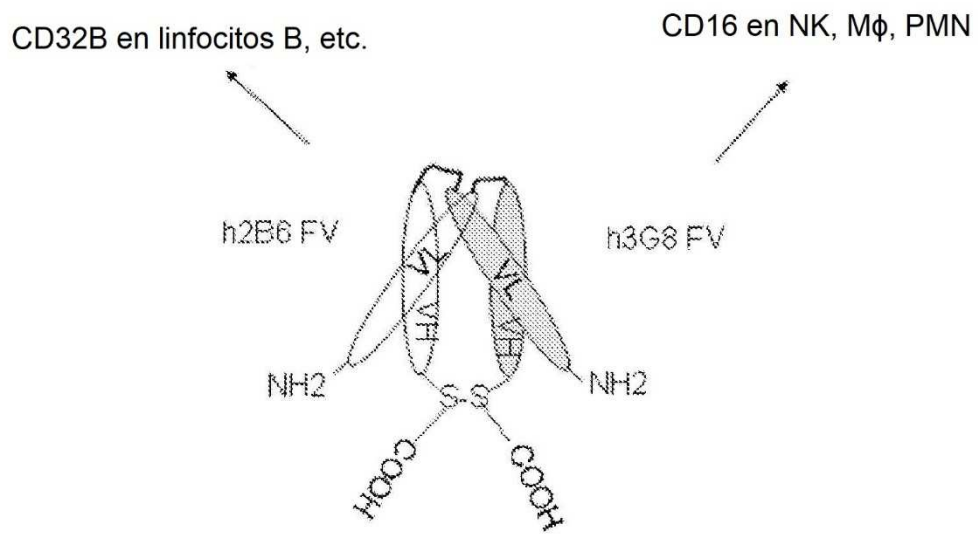
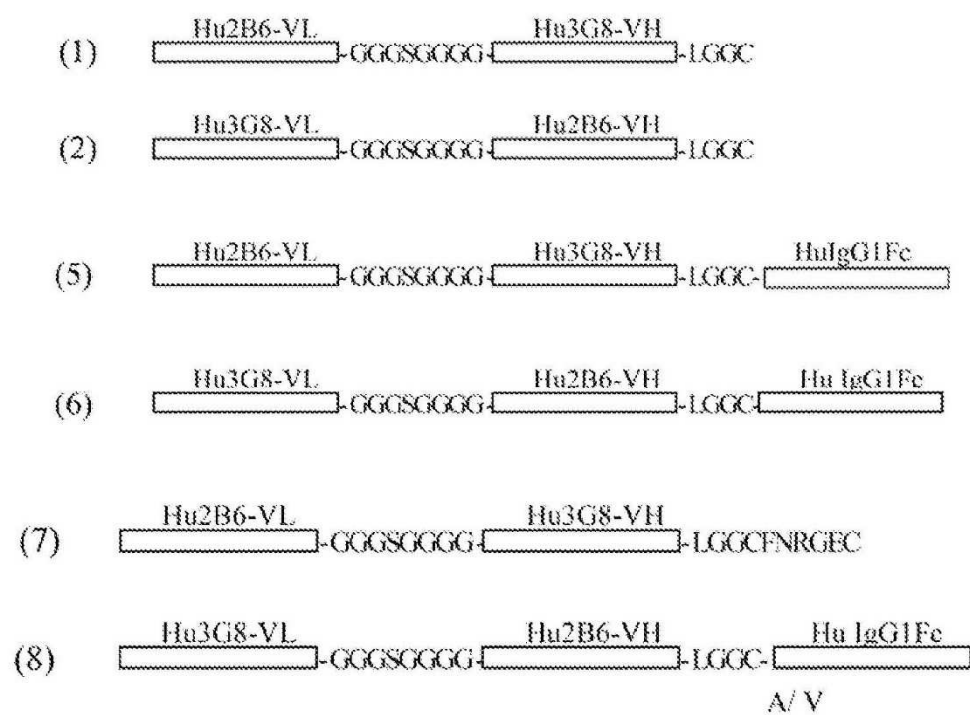


FIG. 8

**FIG. 9**

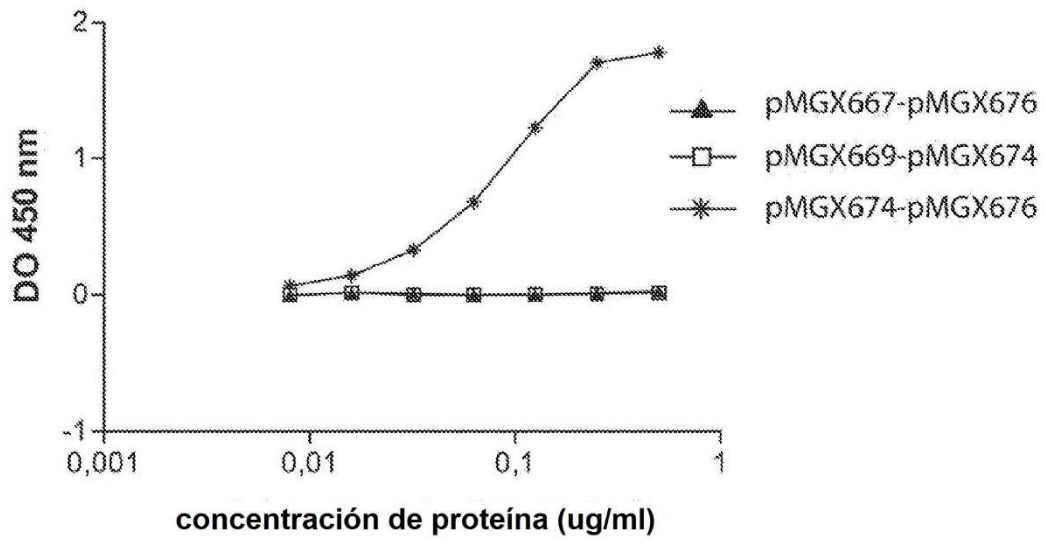


FIG. 10

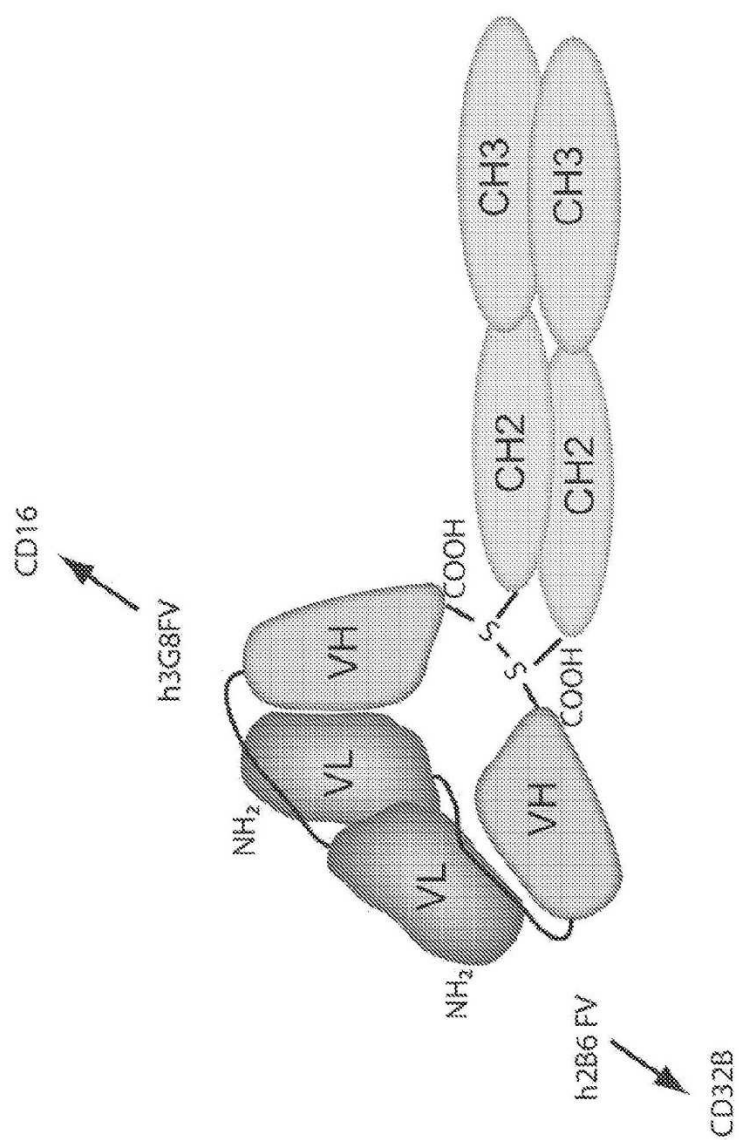


FIG. 11

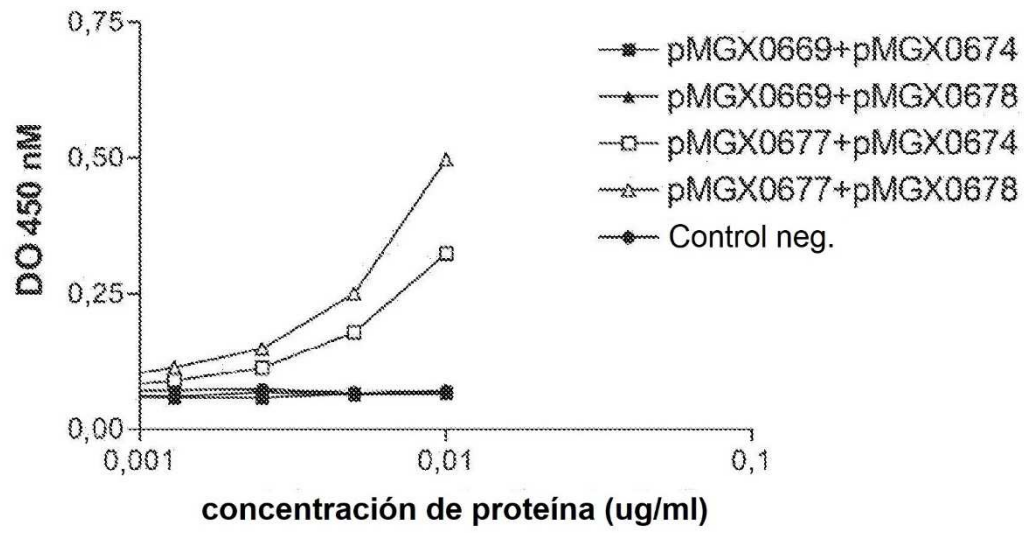


FIG. 12

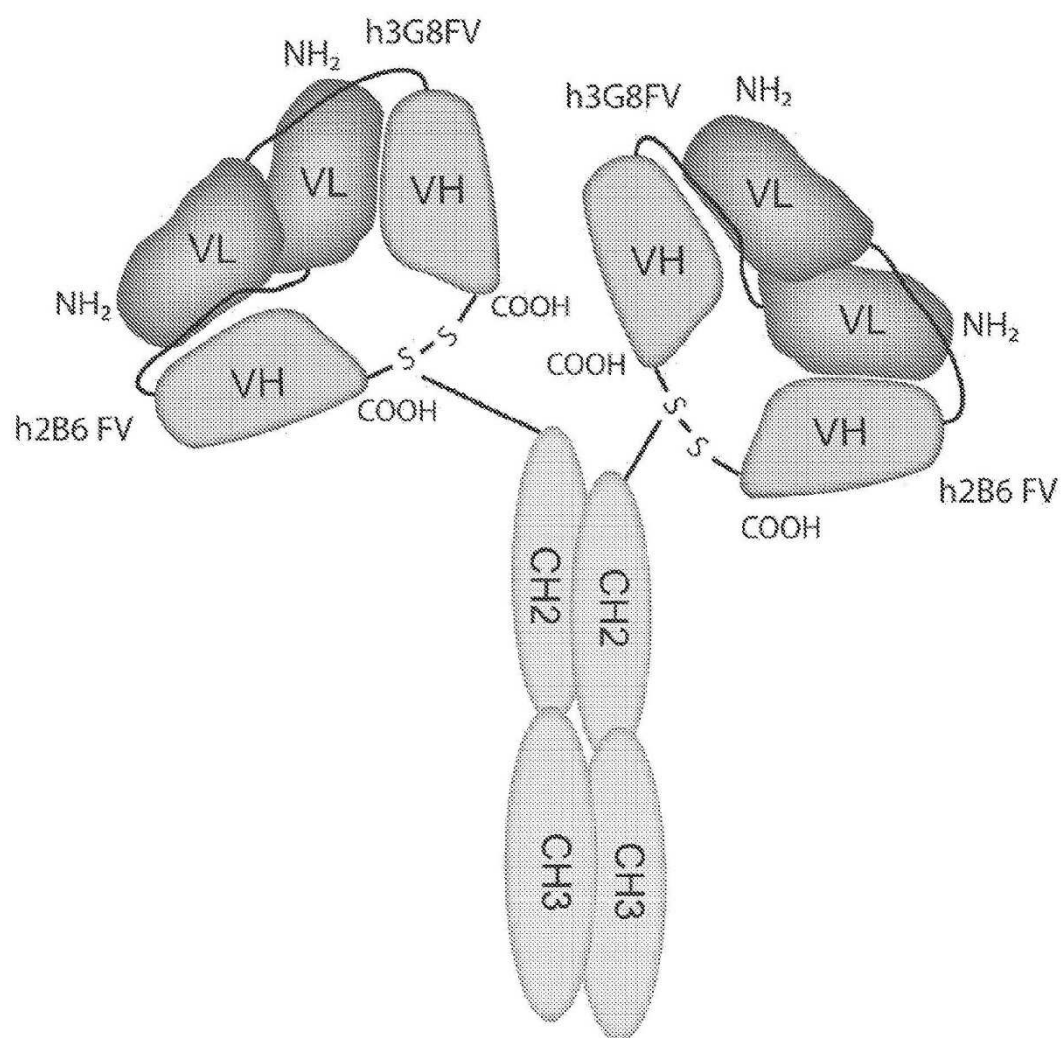


FIG. 13

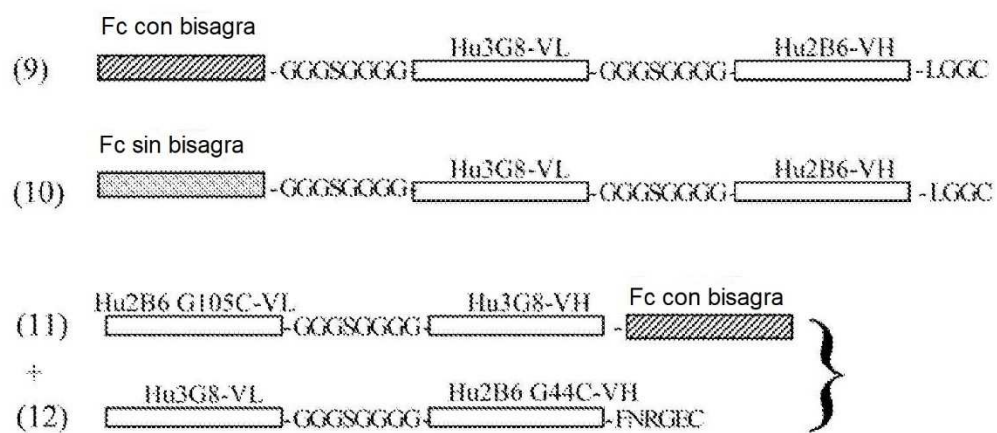


FIG. 14

M 1 2 3

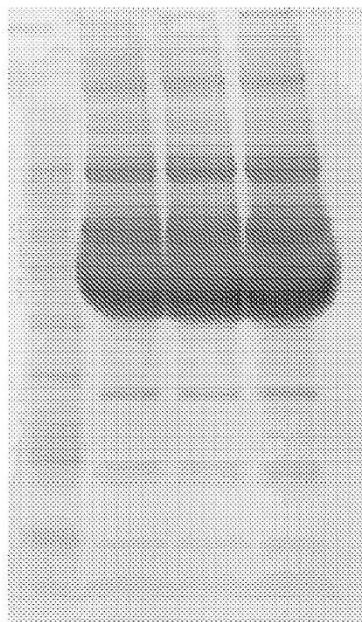


FIG. 15A

3 2 1 M

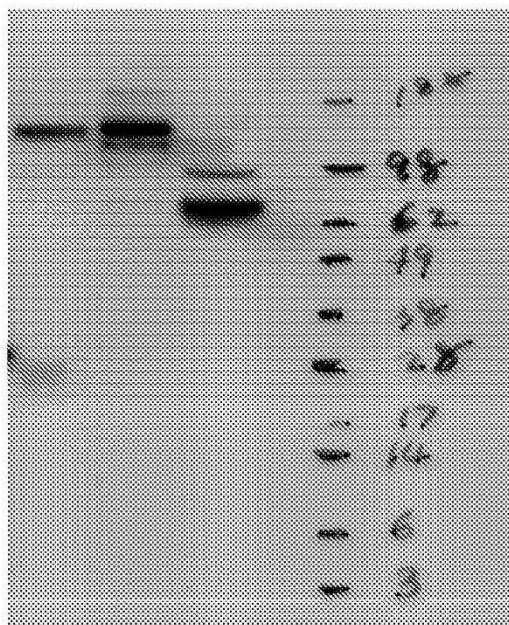


FIG. 15B

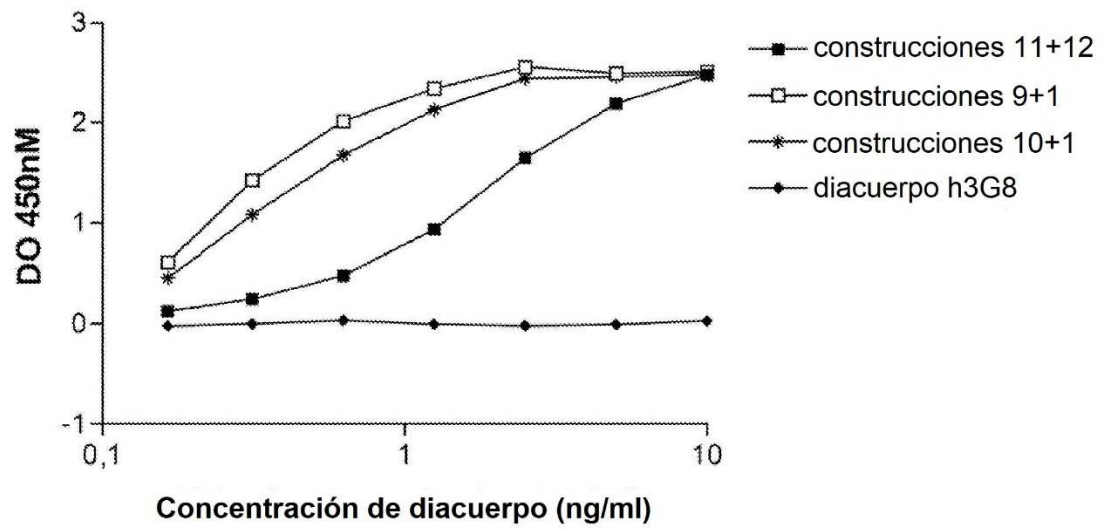


FIG. 16

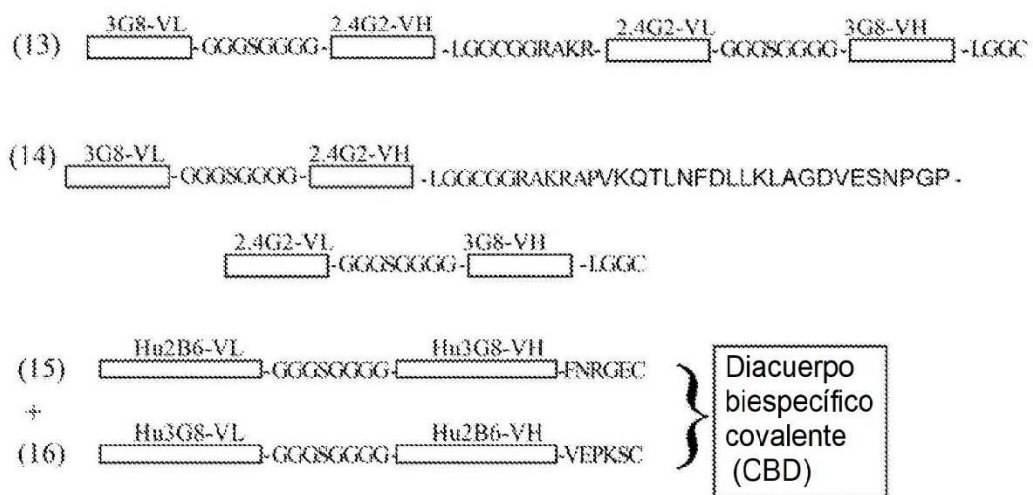


FIG. 17

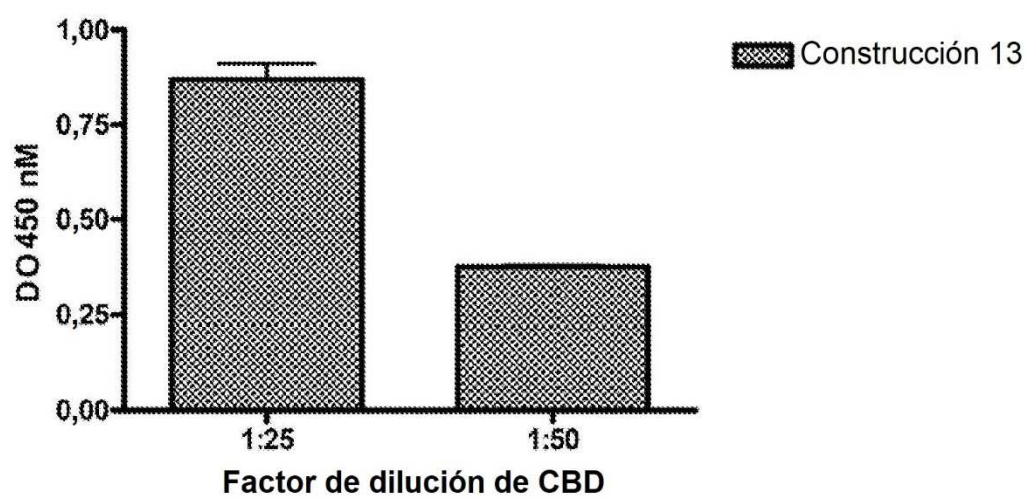


FIG. 18

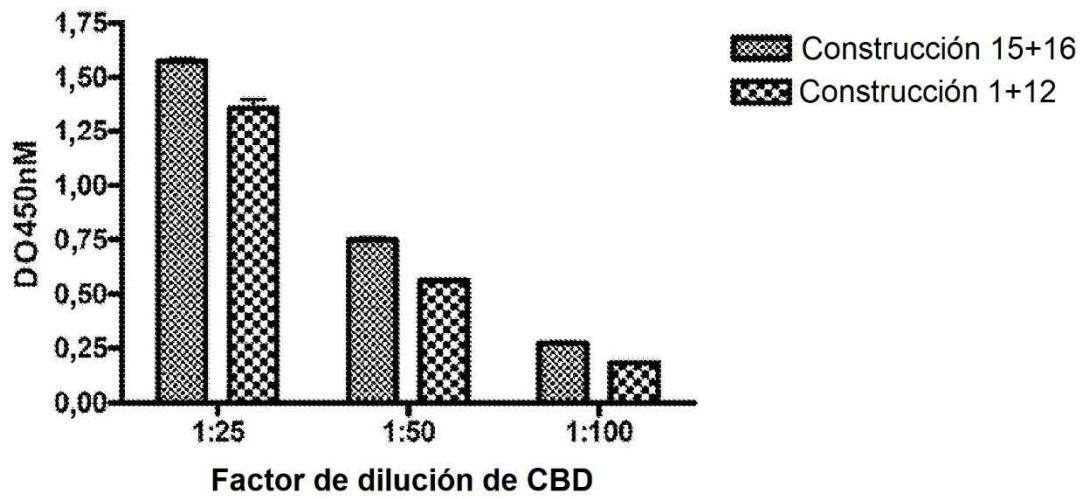


FIG. 19

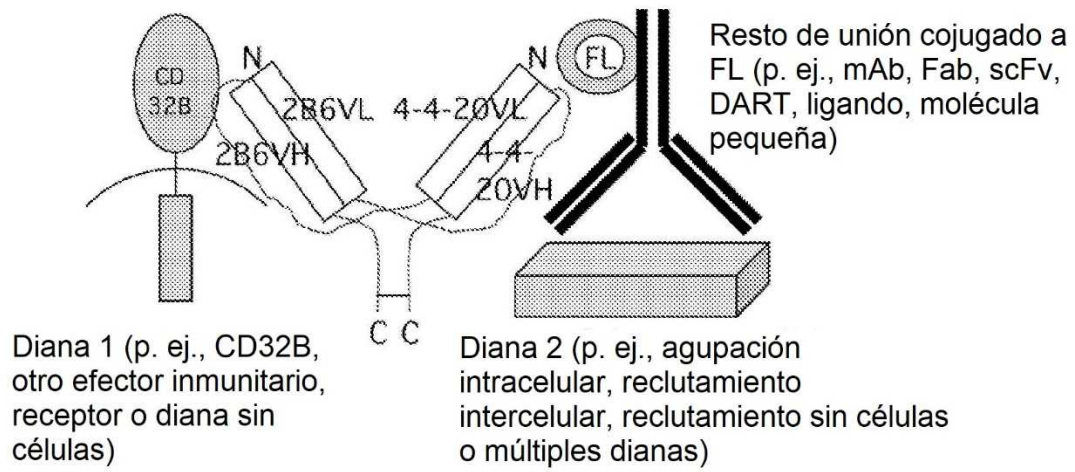


FIG. 20

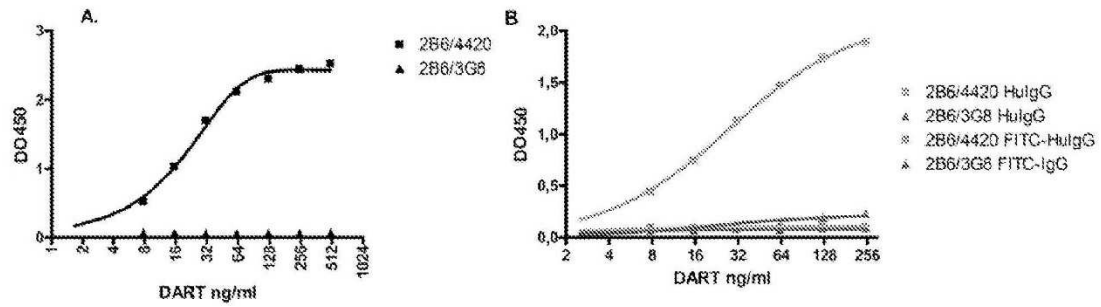


FIG. 21

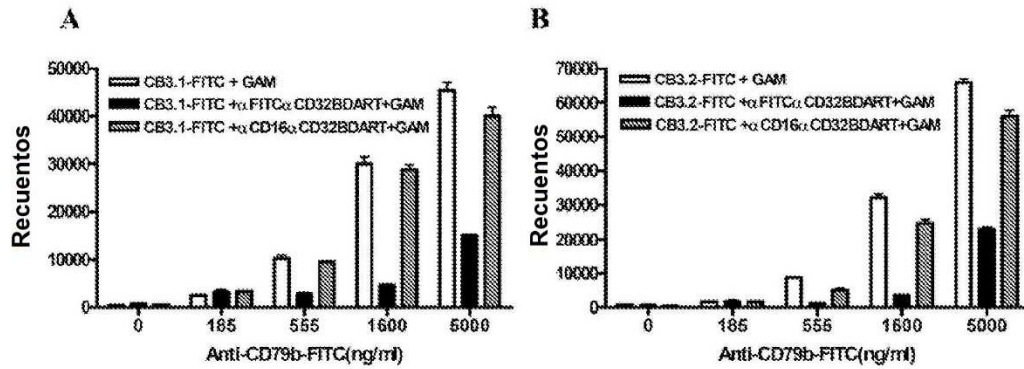


FIG. 22

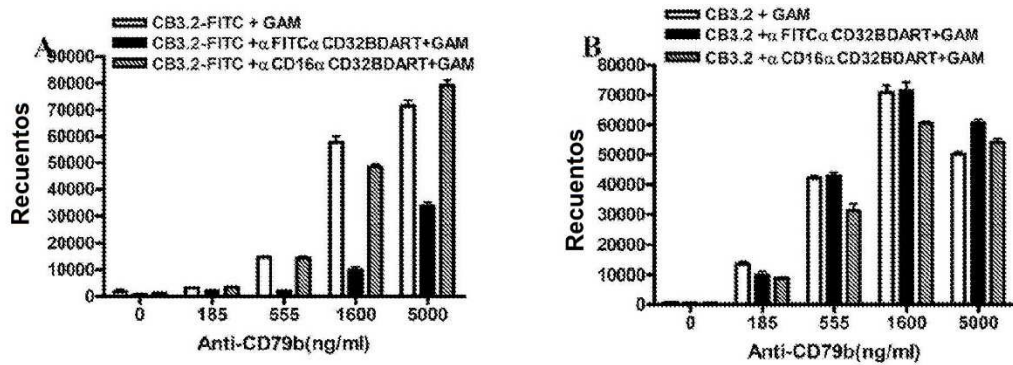


FIG. 23

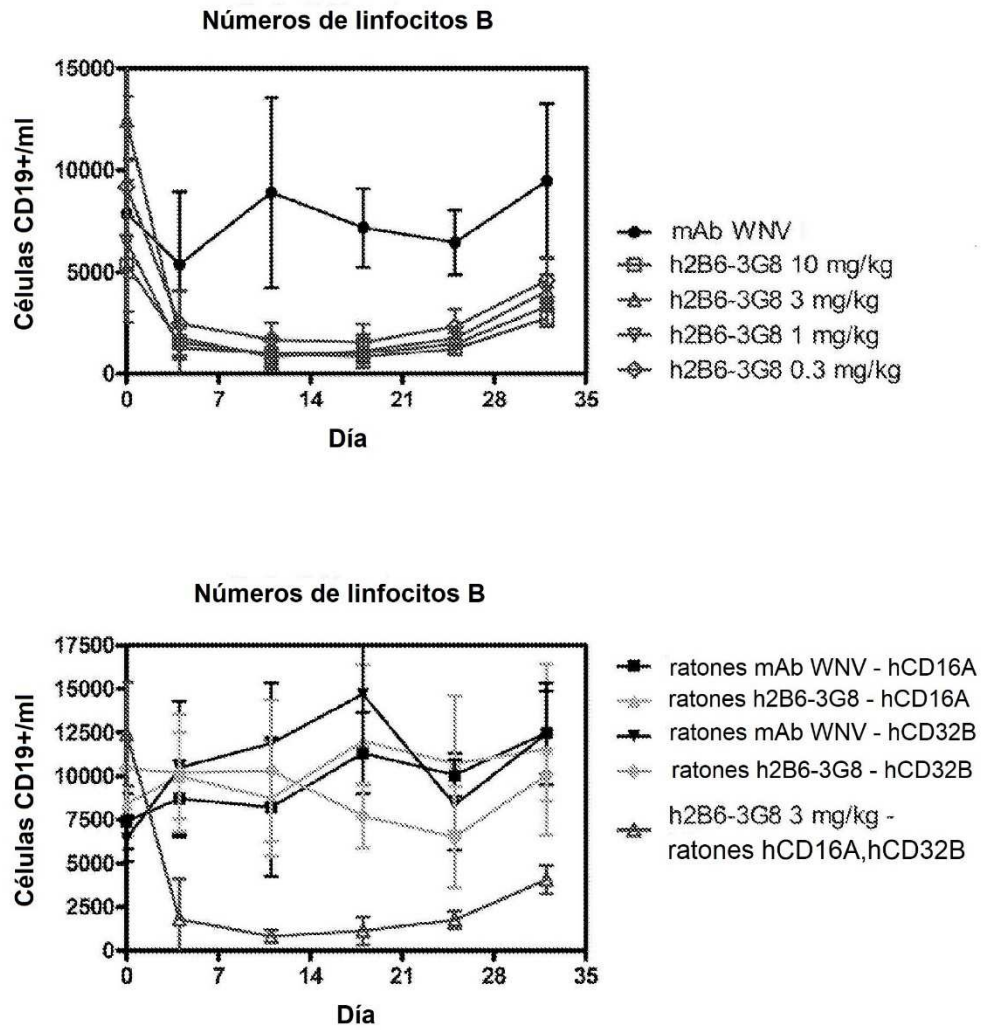


FIG. 24

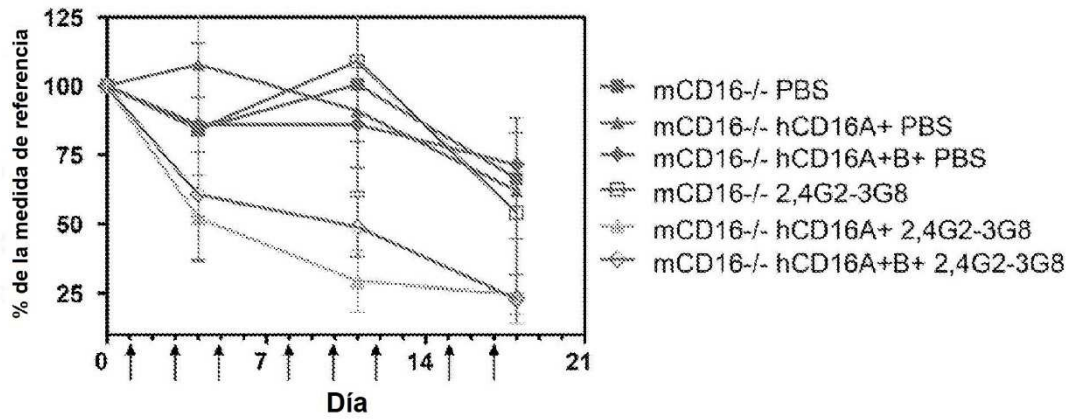


FIG. 25

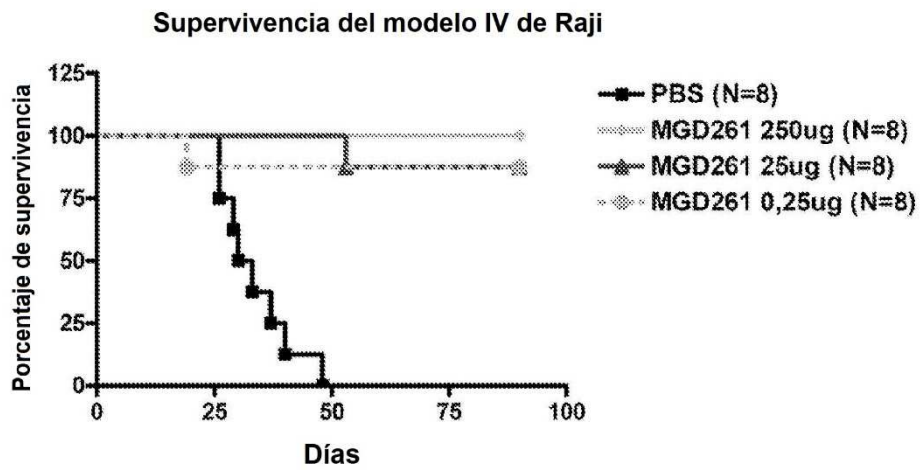


FIG. 26

**DART 3G8.3G8 expresado en E. coli
(SDS-PAGE, SEC)**

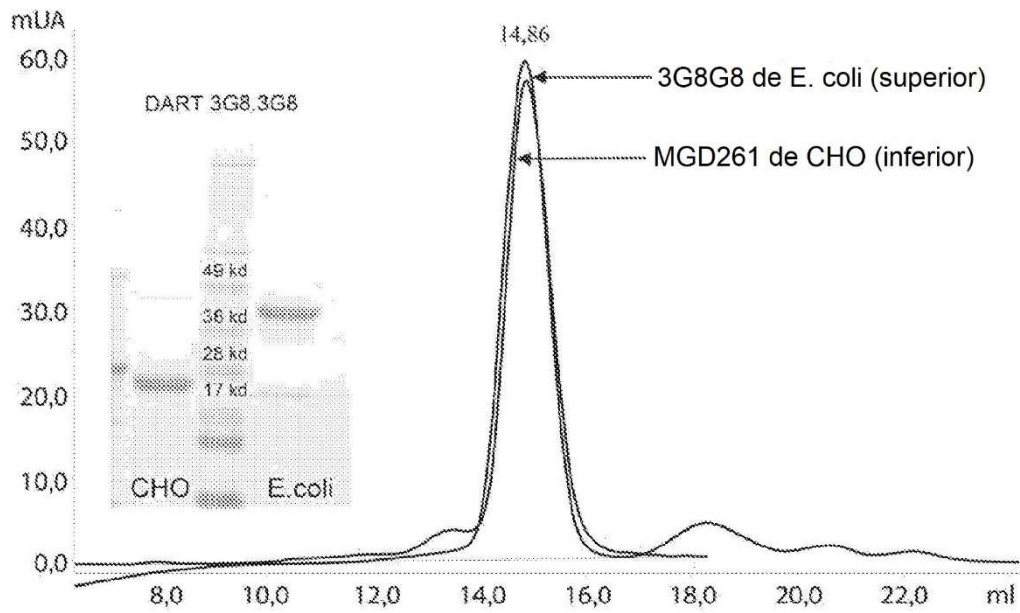


FIG. 27

Elisa de unión de CD16-DART

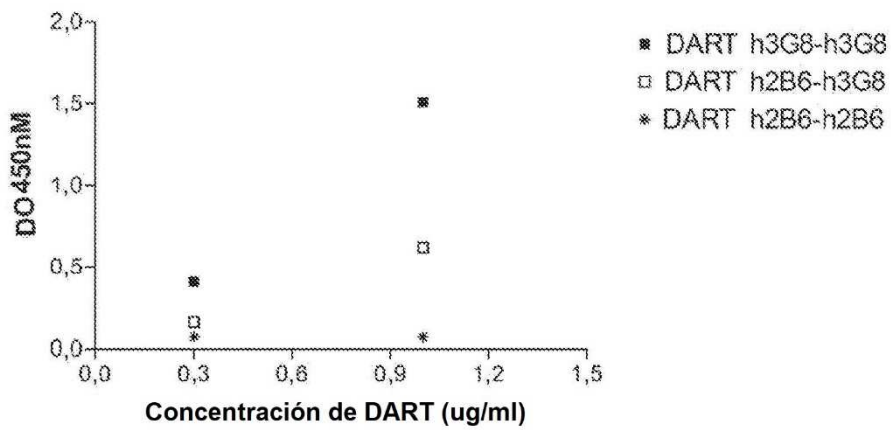


FIG. 28

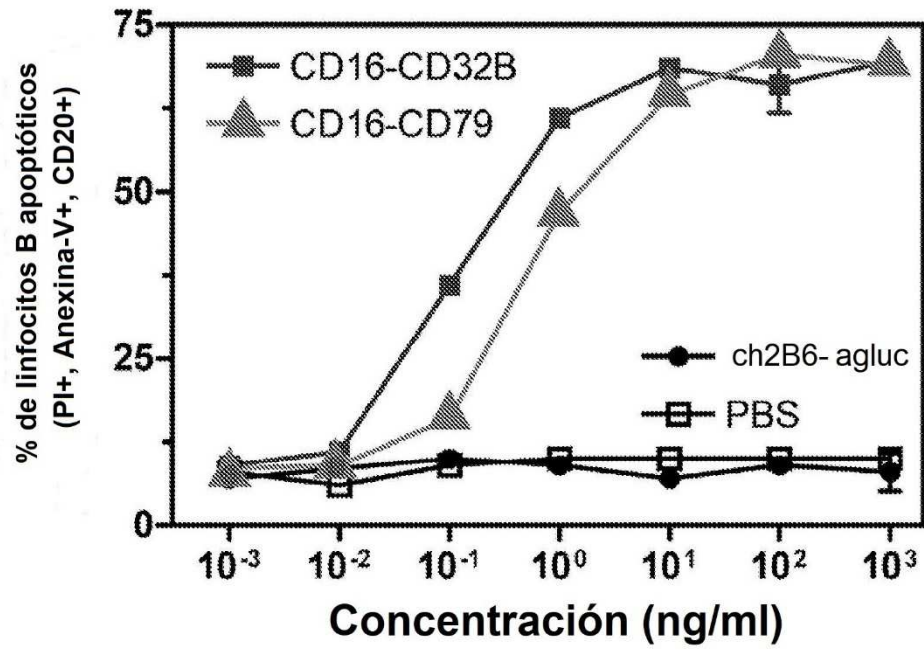


FIG. 29

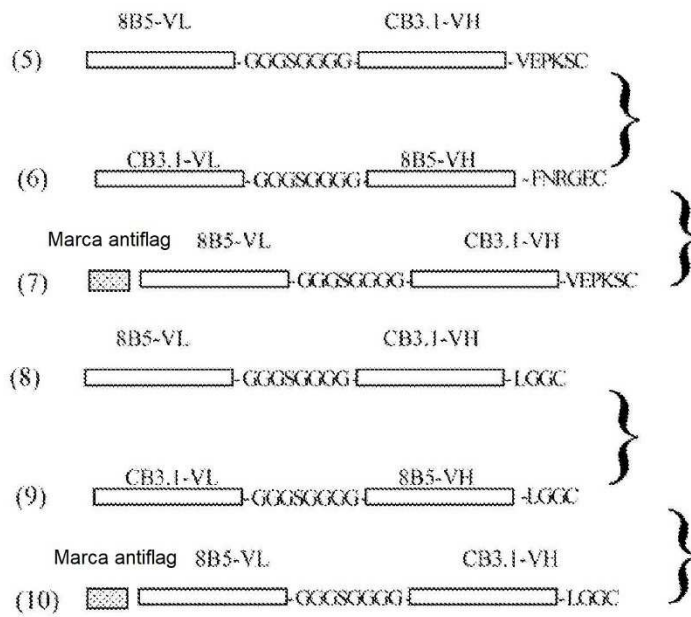


FIG. 30

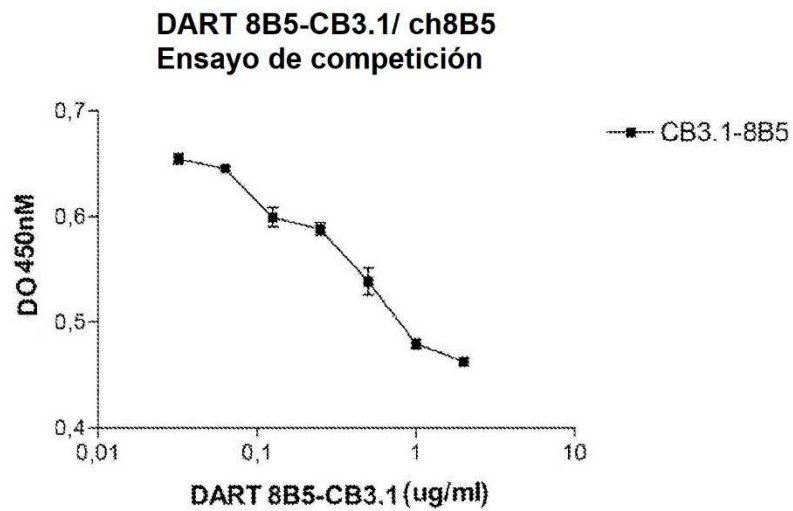


FIG. 31

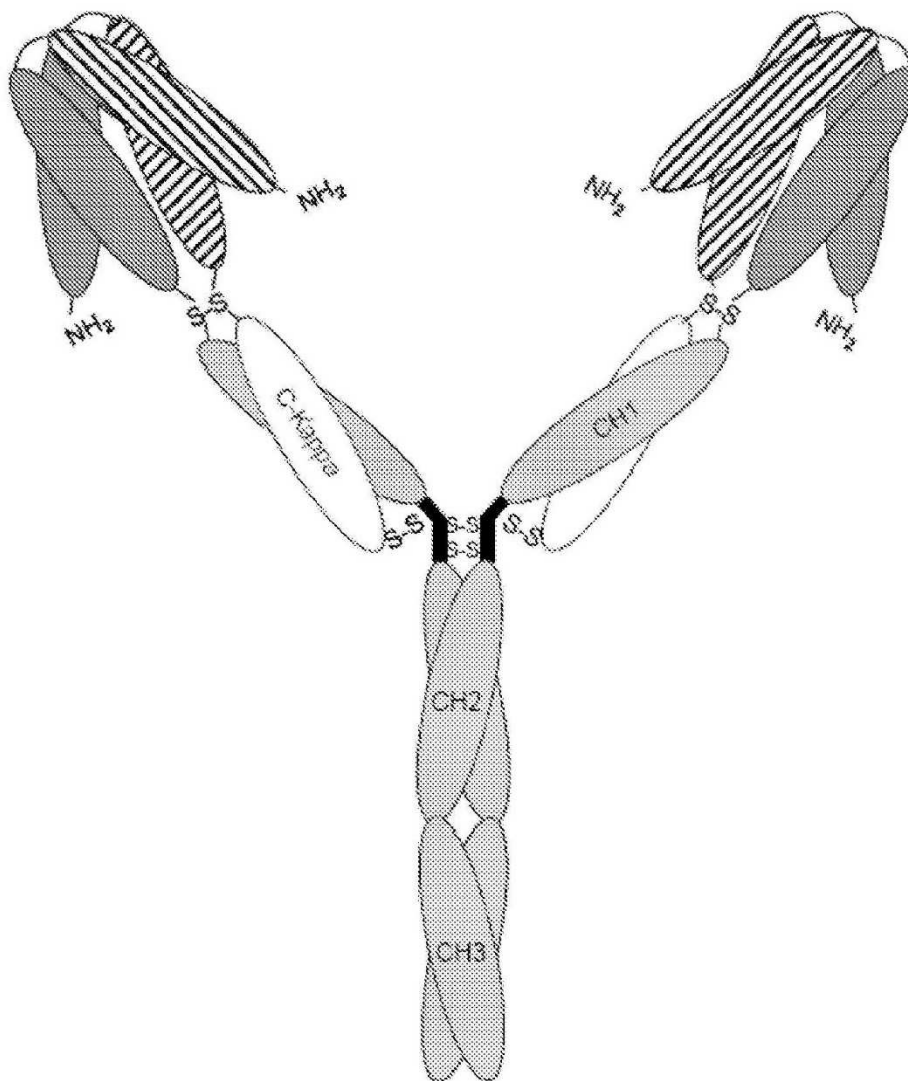
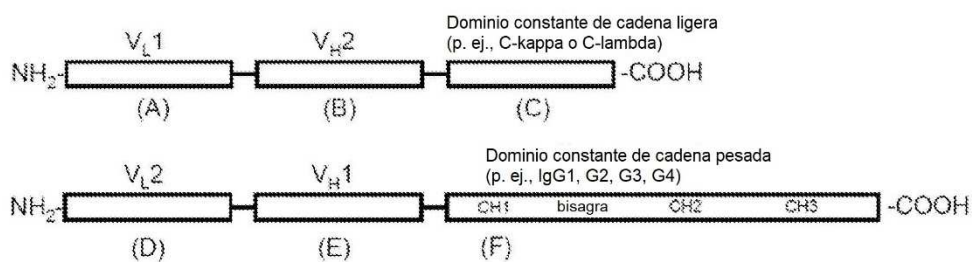


FIG. 32

DART tetraivalente de tipo Ig



(A) + (E) = sitio de unión a epítopo 1
 (D) + (B) = sitio de unión a epítopo 2
 (C) + (F) = C-Kappa/lambda + CH1 (asociación similar que una Ig tradicional)
 bisagra-CH2-CH3 se asociarán para formar un Fc

FIG. 33

ELISA de unión de mCD32-hCD16A

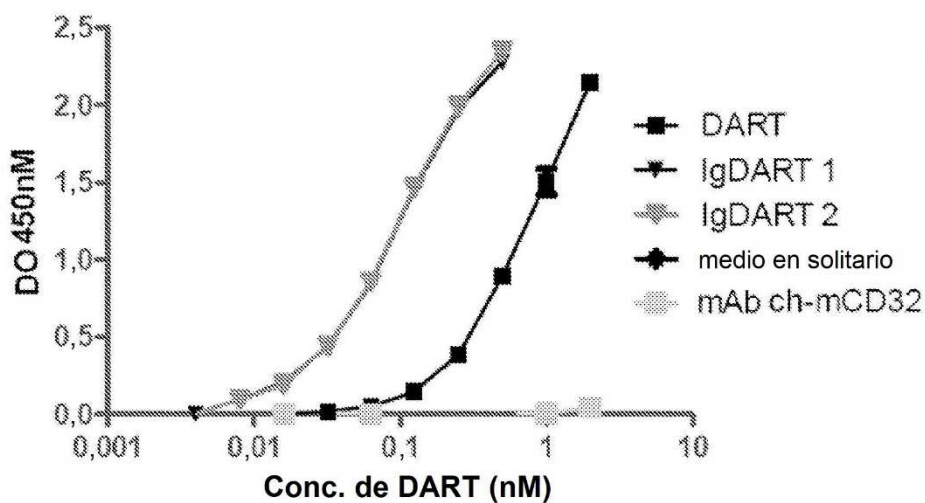


FIG. 34

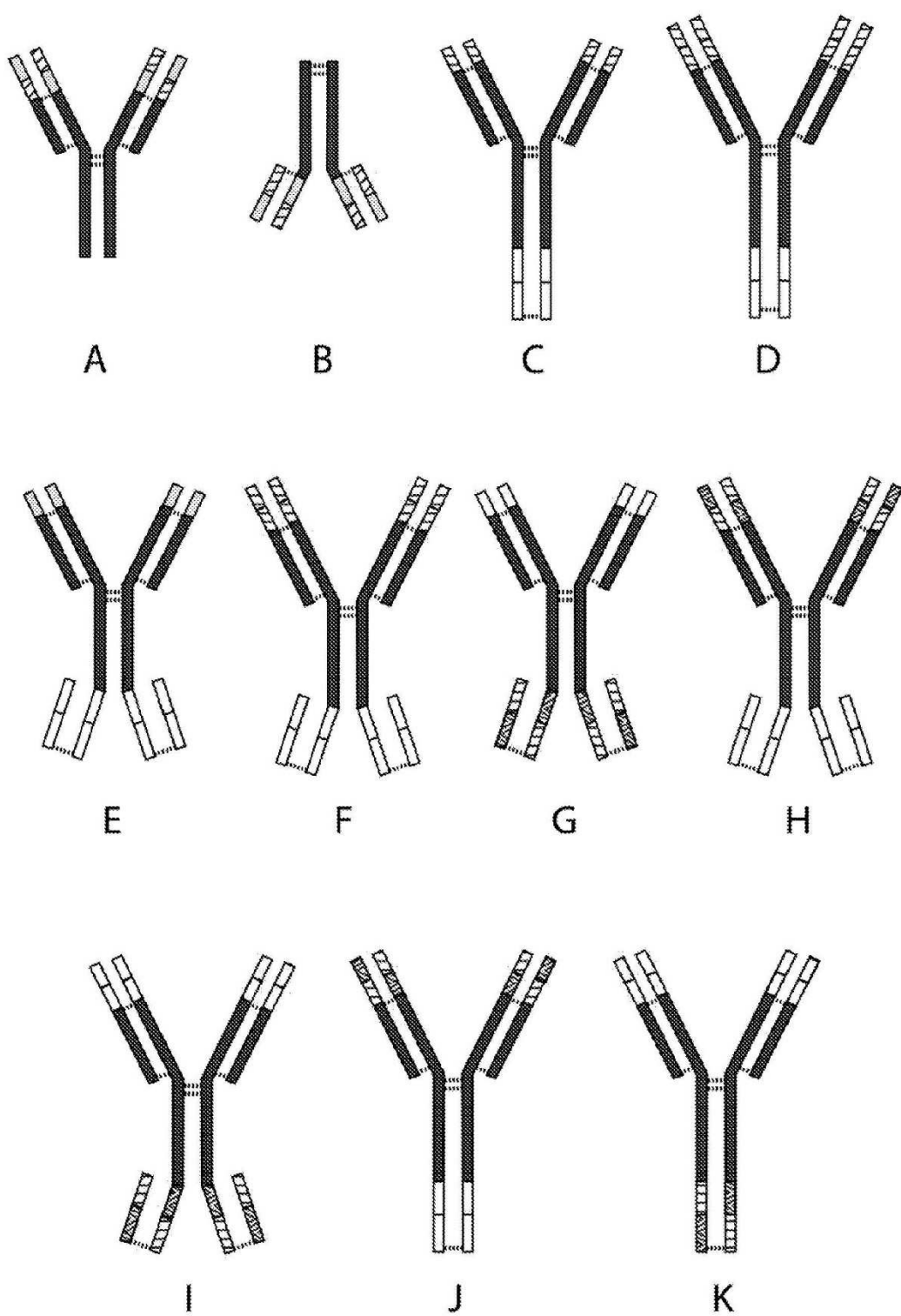


FIG. 35

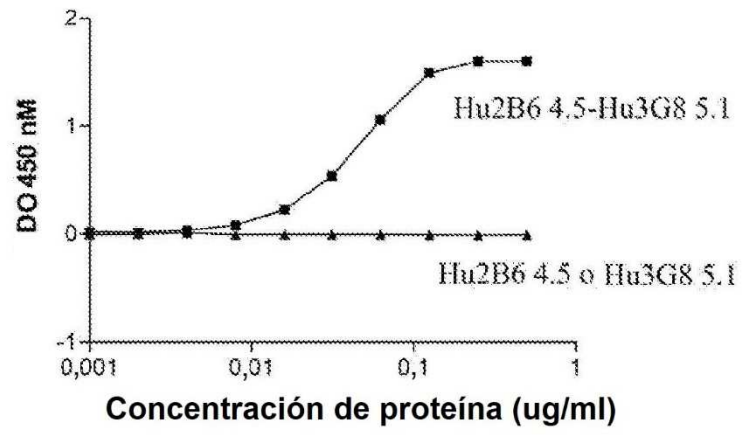


FIG. 36

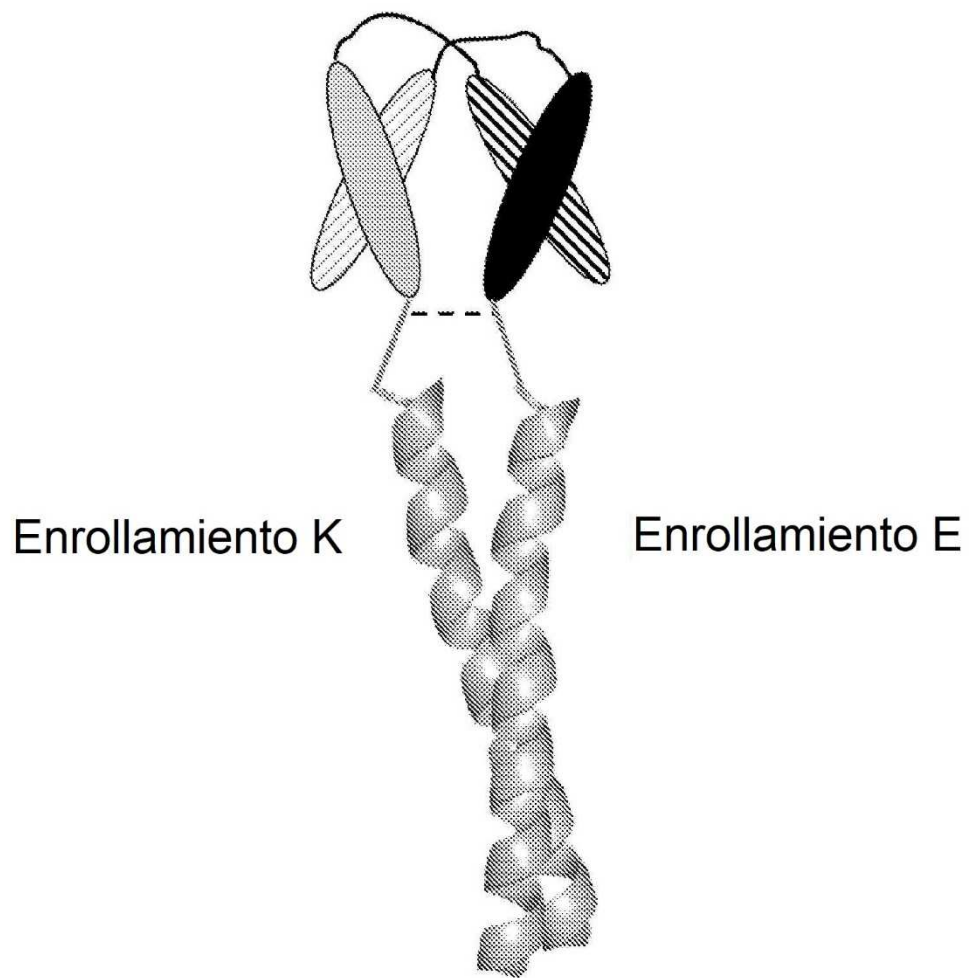


FIG. 37

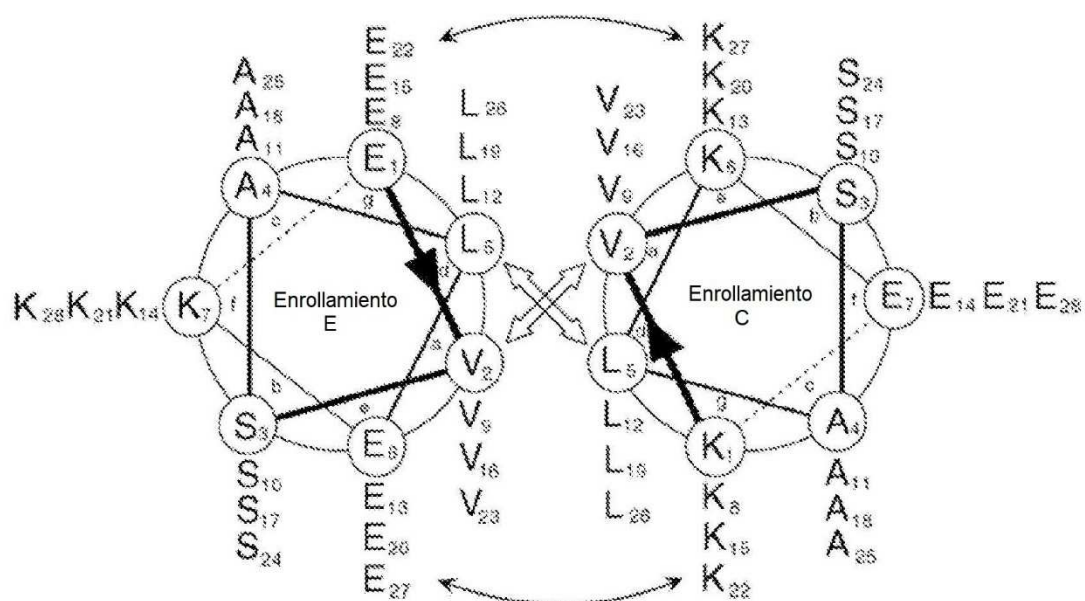


FIG. 38

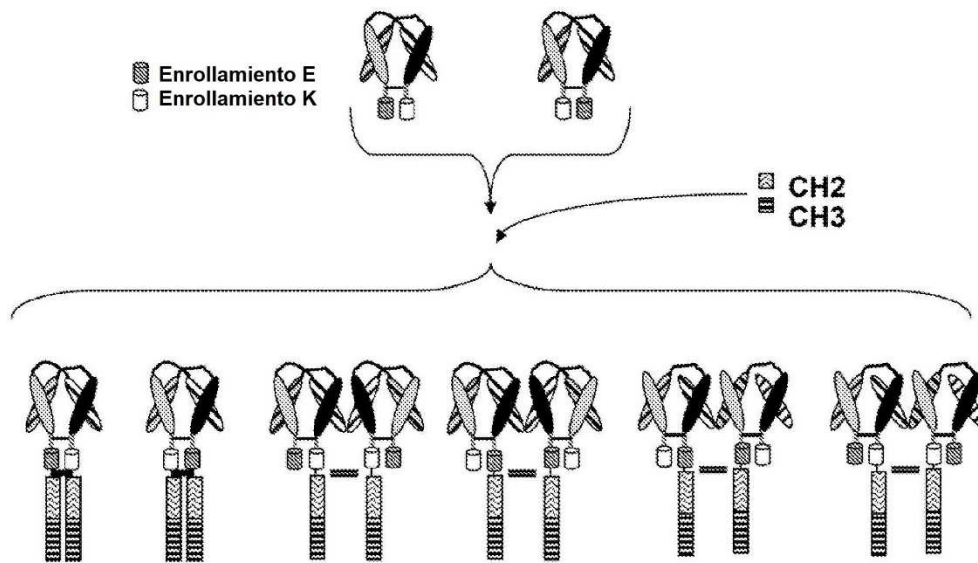


Figura 39

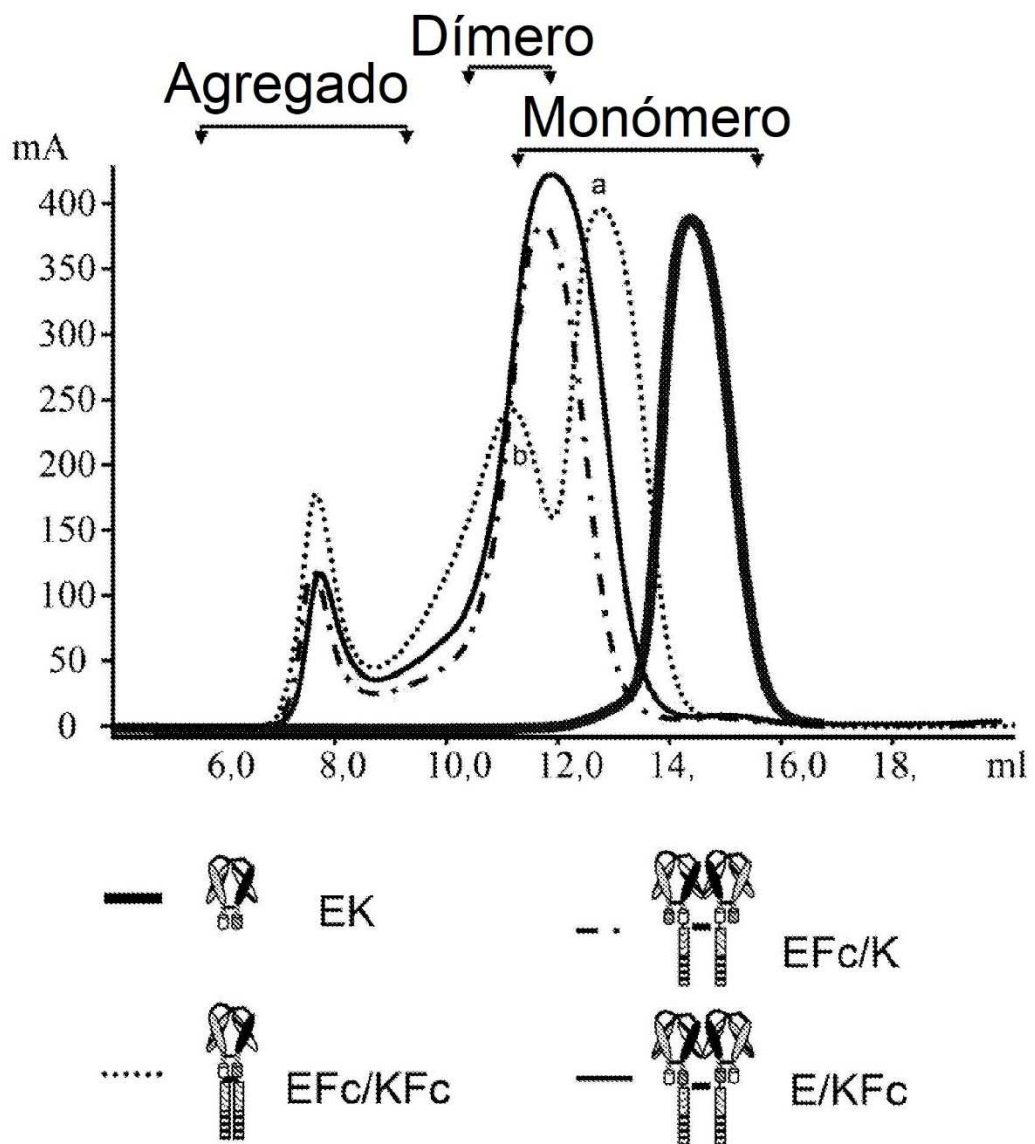


Figura 40

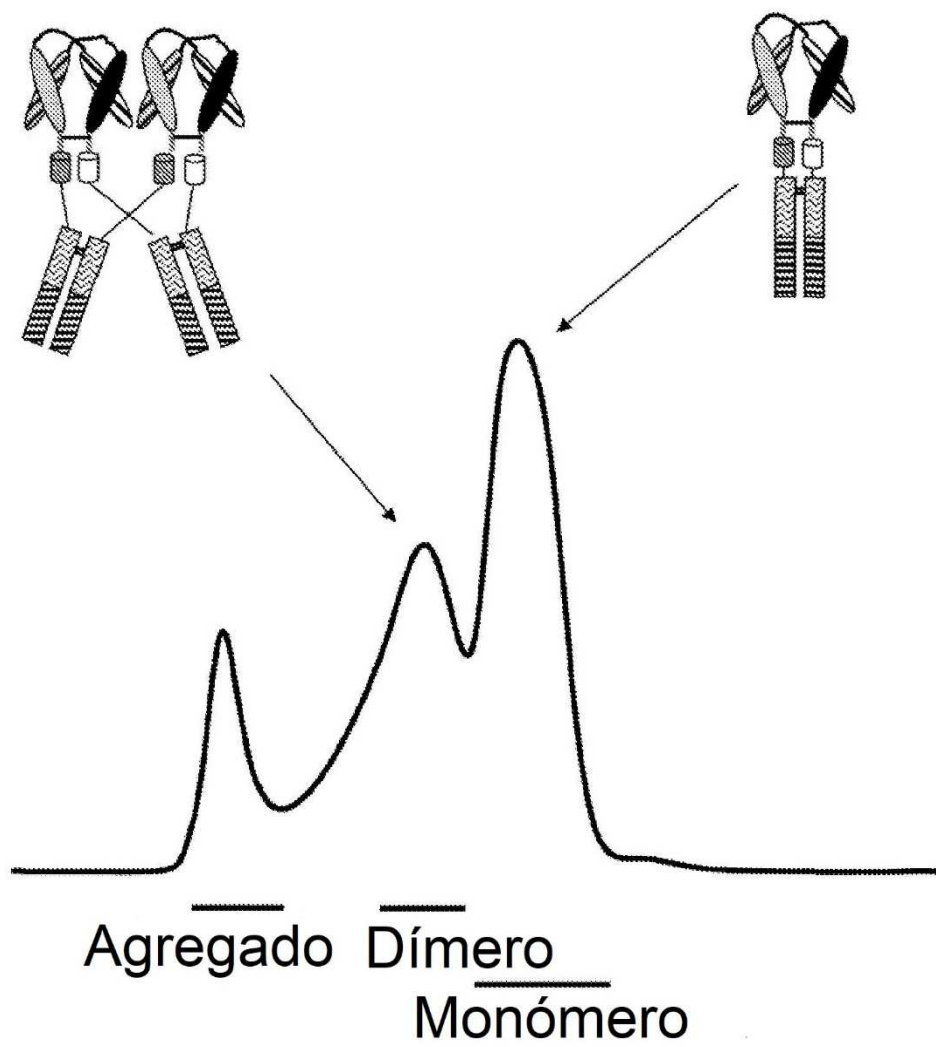


Figura 41

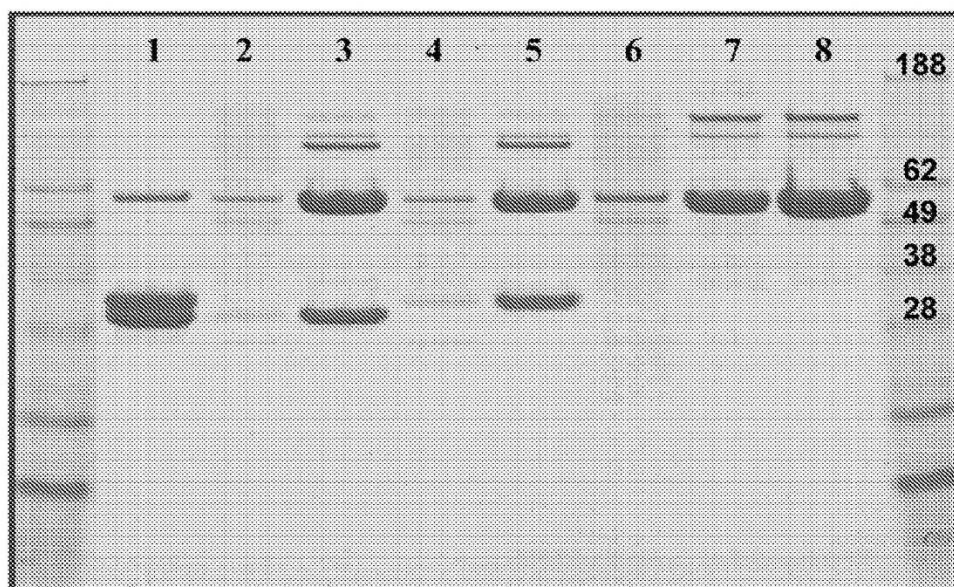


Figura 42

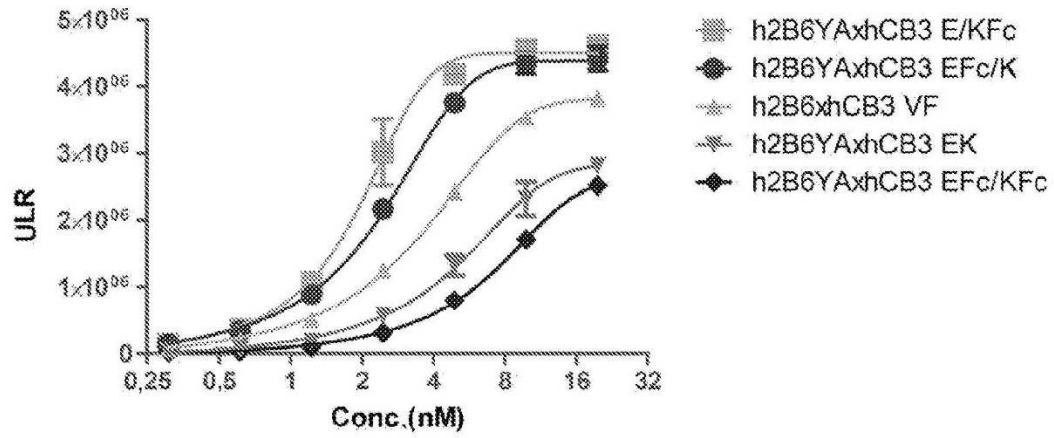


Figura 43

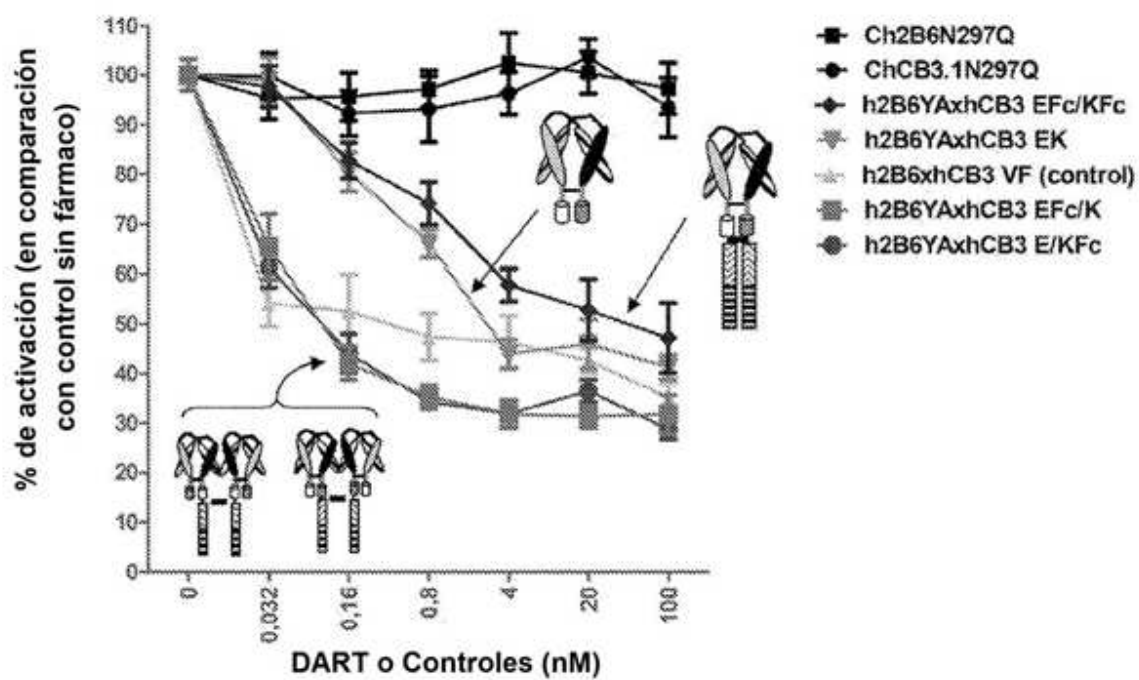


FIGURA 44

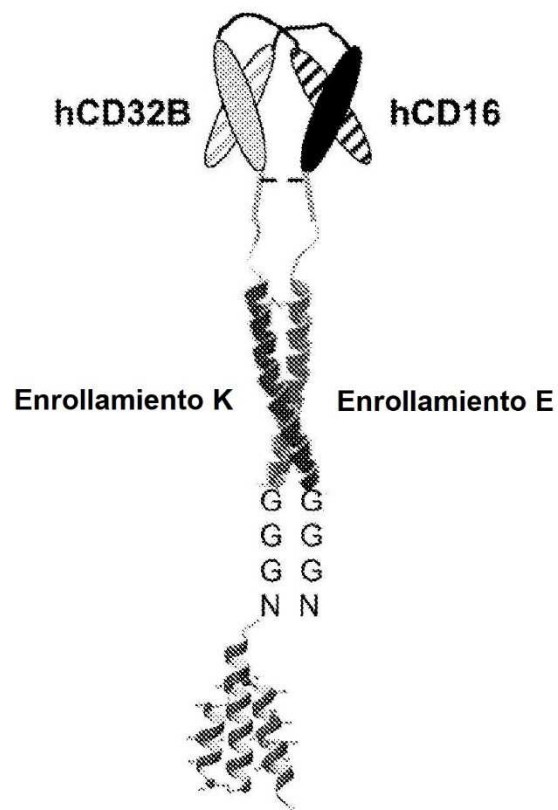


FIG. 45

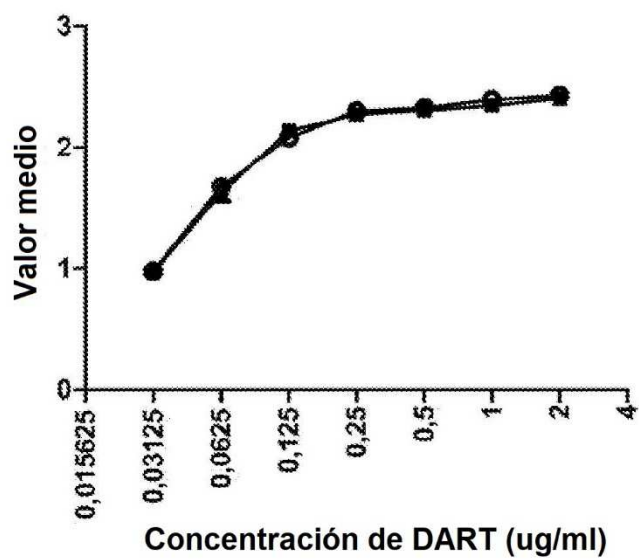


FIG. 46A

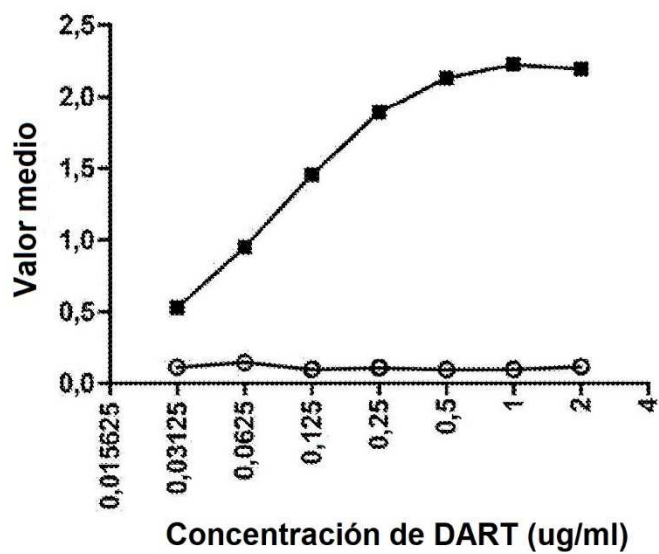


FIG. 46B

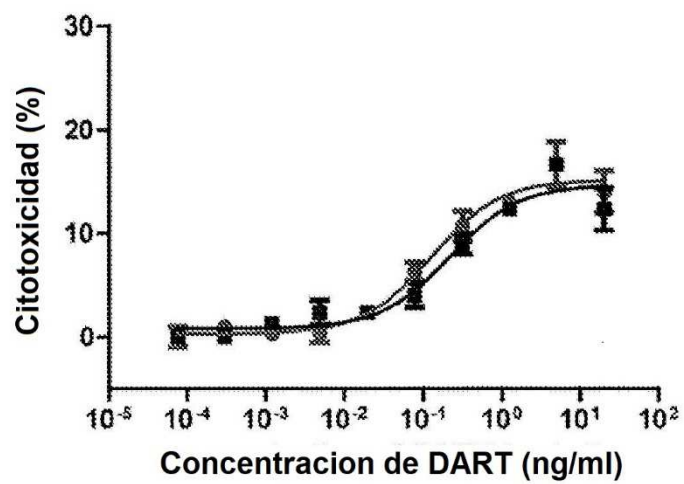


FIG. 47

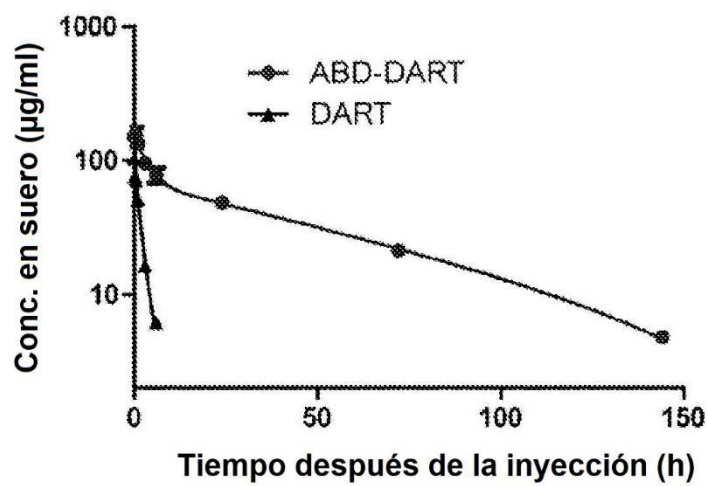


FIG. 48

ZR75-1 (HER2 2+)
Línea celular de cáncer de mama

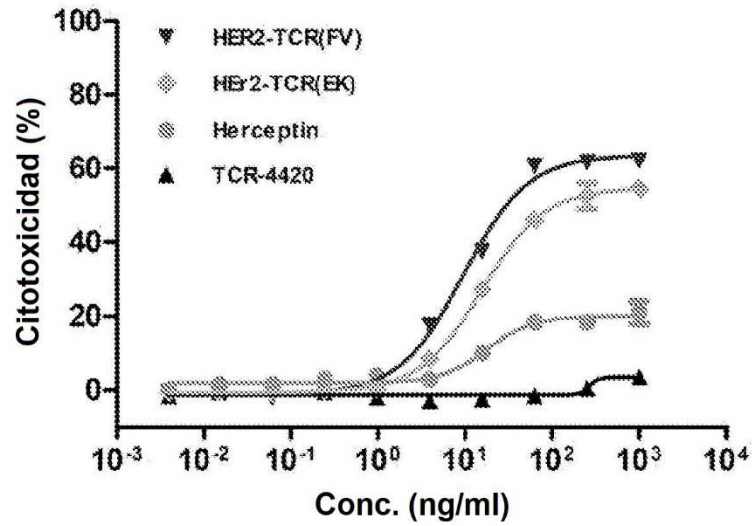


FIG. 49A

MCF-7 (HER2 1+)
Línea celular de cáncer de mama

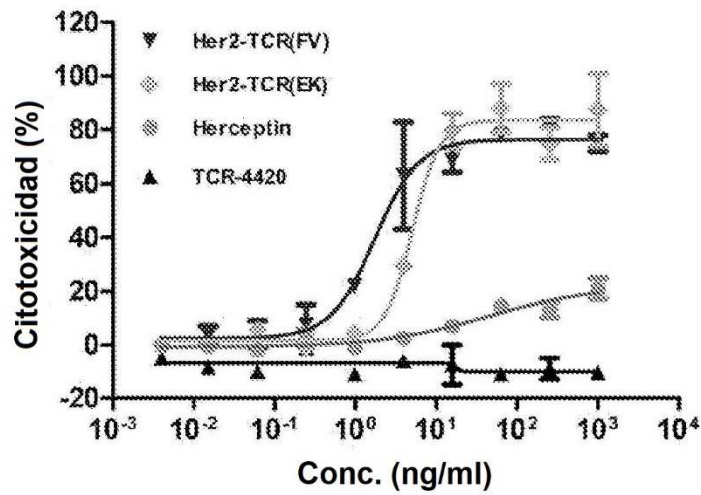


FIG. 49B

MDA-MB468 (HER2 -ve)
Línea celular de cáncer de mama

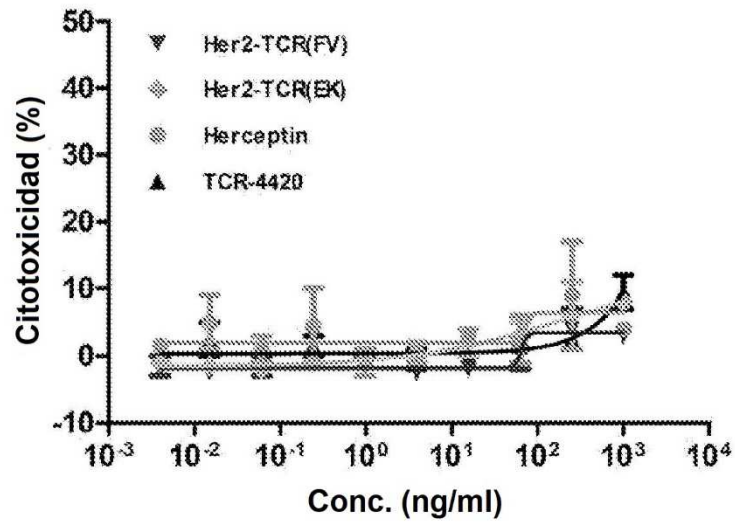


FIG. 49C

HT-29
Línea celular de cáncer de colon

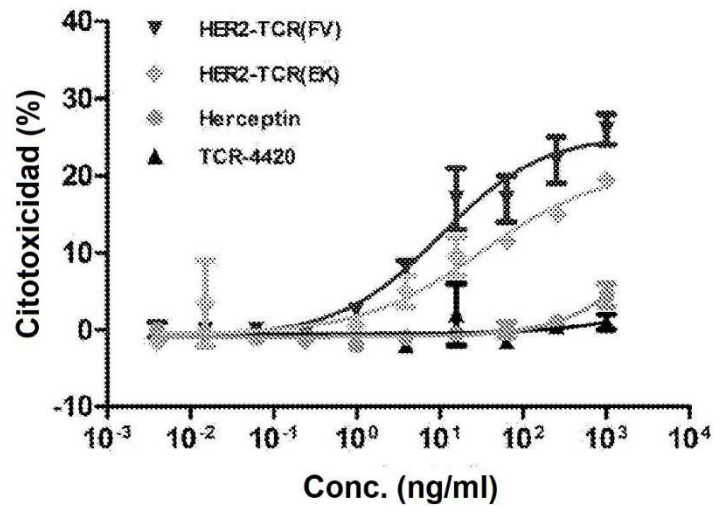
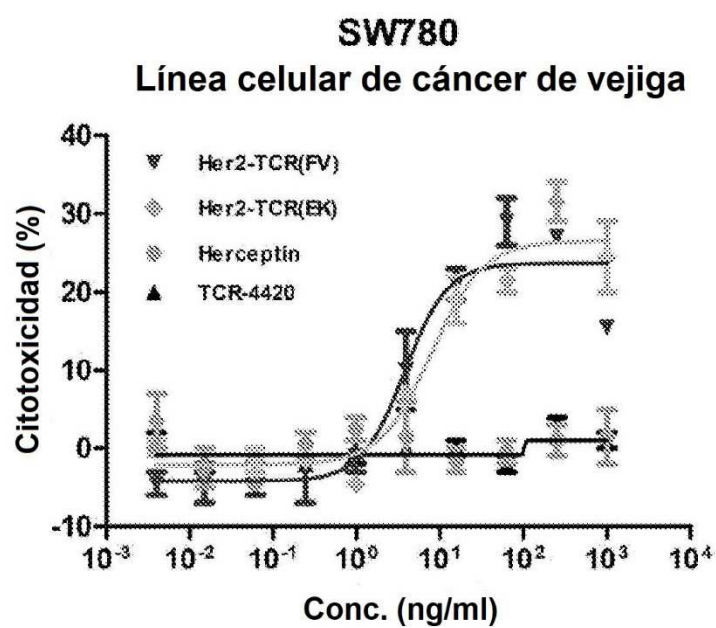


FIG. 49D

**FIG. 49E**