

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 020 458**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2016** **PCT/US2016/045580**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017** **WO17027325**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2016** **E 16835664 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025** **EP 3331564**

54 Título: **Constructos de unión a antígenos dirigidos a moléculas diana**

30 Prioridad:

07.08.2015 US 201562202665 P

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

22.05.2025

73 Titular/es:

IMAGINAB, INC. (100.00%)
423 Hindry Avenue, Unit D
Inglewood, CA 90301, US

72 Inventor/es:

CHAN, CHIO, MUI;
GUDAS, JEAN;
OLAFSEN, TOVE;
SATPAYEV, DAULET, KADYL y
TORGOV, MICHAEL, YURI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 3 020 458 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

Constructos de unión a antígenos dirigidos a moléculas diana

5 CAMPO

Las realizaciones descritas en la presente se refieren de manera general a estructuras de bisagra en constructos de unión a antígeno (como cualquier proteína de fusión scFv, como minicuerpos), así como a los propios constructos de unión a antígeno, así como a métodos para su uso.

10 ANTECEDENTES

En la técnica se conocen una amplia variedad de constructos de unión a antígeno. Tales constructos varían frecuentemente por las secuencias en sus secciones CDR, menos frecuentemente con variaciones en sus regiones marco y otras secciones de los anticuerpos (tales como CH3 y regiones bisagra).

Shi-Zhen Hu et al. (Cancer Res. 1996;56(13):3055-3061, PMID: 8674062) divulga (Resumen): "Se produjo un nuevo fragmento de anticuerpo manipulado (VL-VH-CH3, o "minicuerpo") con unión bivalente al antígeno carcinoembrionario (CEA) mediante fusión genética de un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) T84.66 (anti-CEA) con el dominio CH3 IgG1 humano. Se evaluaron dos diseños para el péptido conector. En el minicuerpo T84.66/212 LD, se usó un conector de dos aminoácidos (generado por fusión de sitios de restricción) para unir la VH y la CH3. En el minicuerpo T84.66/212 Flex, se usó la bisagra de la IgG1 humana más 10 residuos adicionales como péptido de conexión. La cromatografía de exclusión por tamaño de los minicuerpos purificados demostró que ambas proteínas se habían ensamblado en dímeros Mr80.000, como se esperaba. Además, el análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras fue congruente con la formación de enlaces disulfuro en la bisagra del minicuerpo T84.66 Flex. Los minicuerpos purificados mantuvieron una alta afinidad por el CEA (KA, 2 x 10(9) M(-1)) y demostraron una unión bivalente al antígeno. Las propiedades de direccionamiento tumoral se evaluaron in vivo usando ratones atímicos portadores de xenoinjertos de carcinoma de colon humano LS174T. Los minicuerpos T84.66 marcados con 123I demostraron una captación tumoral rápida y elevada, alcanzando un 17% de dosis inyectada/gramo (%ID/g) para el minicuerpo LD y un 33%ID/g para el minicuerpo Flex a las 6 h después de la inyección. El minicuerpo radiyodado también se eliminó rápidamente de la circulación, proporcionando proporciones elevadas de captación tumoral: sanguínea: 44,5 a las 24 h para el minicuerpo LD y 64,9 a las 48 h para el minicuerpo Flex. La rápida localización del minicuerpo T84.66/212 Flex permitió obtener imágenes de los xenoinjertos a las 4 y 19 horas de su administración".

El documento WO 2011/096894 divulga (Resumen): "La divulgación se refiere a marcadores novedosos de células madre pluripotentes y usos de los mismos, y en particular, aunque no exclusivamente, a moléculas de anticuerpos basadas en fragmentos de mAb84 que se unen a células madre pluripotentes indiferenciadas a través de la proteína-1 similar a podocalixina (PODXL)."

Schaefer, J.V. et al. (2010) (Miniantibodies. En: Kontermann, R., Dübel, S. (eds) Antibody Engineering. Vol. 2, páginas 85-100. Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlín, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-01147-4_7. ISBN: 978-3-642-01146-7) divulga (Resumen): "Los anticuerpos recombinantes se han convertido en un componente estándar de la investigación, el diagnóstico y la terapia. En el desarrollo de anticuerpos recombinantes, independientemente del formato final, un constructo monovalente es prácticamente siempre la primera proteína que se prueba. Esto se debe al hecho de que esencialmente todos los sistemas de selección usan tales formatos, y a que la producción periplásmica de fragmentos scFv y Fab se ha convertido en un estándar. No obstante, algunas tareas requieren un aumento de la avidéz a los antígenos respectivos, el anticuerpo, así como el tamaño del fragmento. Una manera conveniente de lograr ambas cosas con bastante rapidez es fusionar una región bisagra seguida de una estructura dimerizante u oligomerizante al extremo C-terminal del fragmento de anticuerpo, creando los denominados "minianticuerpos". En comparación con otros formatos bivalentes o biespecíficos disponibles, los minianticuerpos se distinguen por su libertad rotacional y flexibilidad, siendo similares a los anticuerpos de longitud completa. Este protocolo describe la conversión modular de fragmentos de scFv en minianticuerpos, dando como resultado una estructura final multimerizada con dos o cuatro sitios de unión, y presentamos diferentes dominios de autoasociación adecuados para esta tarea. Además, también proporcionamos información sobre su producción y analizamos cómo mejorar el rendimiento de los fragmentos de anticuerpos solubles."

Olafsen, T. et al. (2010) (Generation of Single-Chain Fv Fragments and Multivalent Derivatives scFv-Fc and scFv-CH3 (Minibodies). En: Kontermann, R., Dübel, S. (eds) Antibody Engineering. Vol. 2, páginas 69-84. Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlín, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-01147-4_6. ISBN: 978-3-642-01146-7) divulga (Resumen): "Los fragmentos de anticuerpos de tamaño intermedio, como scFv-CH3 (minicuerpos) y scFv-Fc, conservan una elevada avidéz por su antígeno debido a su naturaleza de bivalencia. Además, la incorporación de la región Fc permite la generación de fragmentos de anticuerpos con una variedad de funciones biológicas y propiedades farmacocinéticas. Este protocolo describe el aislamiento de genes variables a partir de células de hibridoma, el ensamblaje de genes, la clonación y la expresión estable de estos fragmentos en células de mamífero. Estos fragmentos se expresan como cadenas peptídicas únicas que evitan los problemas de la coexpresión de cadenas

ligeras y pesadas de inmunoglobulina. También se incluye un protocolo para cribar clones de alta expresión y sugerencias para la purificación y caracterización bioquímica de las proteínas purificadas".

El documento US 2013/323236 divulga (Resumen): "La presente invención proporciona un anticuerpo de la clase IgG4 que comprende por lo menos una cadena pesada que comprende un dominio CH1 y una región bisagra, en donde en cada cadena pesada: a. la cisteína intercadena en la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, en el dominio CH1 se sustituye por otro aminoácido; y b. uno o más de los aminoácidos colocados en la región bisagra superior se sustituye por cisteína."

El documento US 2014/286951 divulga (Resumen): "La presente invención se refiere a agentes de unión que se unen específicamente a MET humano, agentes de unión que se unen específicamente a uno o más componentes de la vía WNT, agentes bispecíficos que se unen tanto a MET humano como a uno o más componentes de la vía WNT, y métodos de uso de los agentes para tratar enfermedades como el cáncer".

El documento US 2014/302035 divulga (Resumen): "En la presente se proporcionan Fcs en tándem y anticuerpos Fc en tándem ("TFcAs"), por ejemplo, anticuerpos bispecíficos Fc en tándem ("TFcBAs"), que comprenden uno o por lo menos dos sitios de unión que se unen específicamente a uno o más receptores de superficie celular. Los sitios de unión están conectados a través de un TFc, TFc que comprende una primera región Fc y una segunda región Fc, en donde la primera y la segunda regiones Fc están enlazadas a través de un conector TFc para formar un polipéptido contiguo y dimerizarse para formar un dímero Fc. Los TFcBA ejemplares se unen a los receptores de superficie celular c-Met y EpCam e inhiben la transducción de señales a través del receptor o receptores de superficie celular para los que son específico los sitios de unión del TFcBAs".

SUMARIO

LA PRESENTE INVENCION SE EXPONE EN LAS REIVINDICACIONES ADJUNTAS. BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra una ilustración de un minicuerpo (Mb) manipulado.

La FIG. 2 muestra una ilustración de varias realizaciones de bisagras de Mb basadas en IgG1 humana (γ1 EH1 parte superior y γ1 EH2 parte inferior).

La FIG. 3 muestra una ilustración de varias realizaciones de bisagras de Mb basadas en IgG2 humana (γ2 EH1 parte superior y γ2 EH2 parte inferior).

La FIG. 4 muestra una ilustración de varias realizaciones de bisagras de Mb adicionales basadas en IgG2 humana (γ2 NH1 parte superior y γ2 NH2 parte inferior).

La FIG. 5A muestra imágenes del análisis SDS-PAGE no reducido de las variantes de bisagra de IAB2M.

La FIG. 5B muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB2M γ1 EH1.

La FIG. 5C muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB2M γ1 EH2.

La FIG. 5D muestra información sobre la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB2M γ2 EH2.

La FIG. 5E muestra información sobre la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB2M-γ2 EH1.

La FIG. 6A muestra el análisis de masas intactas de la variante IAB2M γ1 EH1. El panel superior muestra el cromatograma de iones totales en condiciones de fase inversa. El panel central muestra las masas intactas deconvolucionadas que confirman la presencia de medias moléculas y el panel inferior muestra las masas de tamaño completo que se identificaron.

La FIG. 6B muestra el análisis de masas intactas de la variante IAB2M γ2 EH1. El panel superior muestra el cromatograma de iones totales en condiciones de fase inversa. El panel central muestra las masas intactas deconvolucionadas que confirman la presencia de medias moléculas y el panel inferior muestra las masas moleculares de tamaño completo que se identificaron.

La FIG. 6C muestra el análisis de masas intactas de la variante IAB2M γ1 EH2. El panel superior muestra el cromatograma de iones totales en condiciones de fase inversa. El panel central muestra las masas intactas deconvolucionadas que confirman la presencia de medias moléculas y el panel inferior muestra las masas moleculares de tamaño completo que se identificaron.

La FIG. 6D muestra el análisis de masas intactas de la variante IAB2M γ2 EH2. El panel superior muestra el cromatograma de iones totales. El panel inferior muestra las masas intactas deconvolucionadas que confirman la presencia de las moléculas de masa de tamaño completo. No se detectaron medias moléculas.

La FIG. 7A muestra las curvas de unión y los valores de unión EC50 de las variantes de bisagra manipuladas de IAB2M determinados por FACS usando células LNCaP-AR.

La FIG. 7B muestra las curvas de unión y los valores de unión EC50 de las variantes de bisagra manipuladas de IAB2M determinadas por FACS usando células C4-2 XCL.

La FIG. 7C muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB2M γ1 EH3 sin una secuencia de señal canónica.

La FIG. 7D muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB2M γ1 EH3 sin una secuencia de señal canónica.

La FIG. 7E muestra información de la secuencia de ADN para IAB2M γ1 EH3 sin una secuencia de señal canónica.

La FIG. 8 muestra una lista de péptidos que contienen disulfuro identificados dentro del dímero IAB2M γ1 EH1.

La FIG. 9 muestra una ilustración de un mapeo de los enlaces disulfuro de IAB2M γ 1 EH1 indicando dónde se forman cisteínas mal emparejadas.

La FIG. 10 muestra una ilustración de un mapeo de los enlaces disulfuro de IAB2M γ 2 EH1 que sugiere la ausencia de cisteínas mal emparejadas.

La FIG. 14A muestra el análisis de masas intactas de la variante IAB22M γ 2 EH1. El panel superior muestra el cromatograma de iones totales. El panel central muestra las masas intactas deconvolucionadas que confirman la presencia de medias moléculas y el panel inferior muestra las masas de tamaño completo que se identificaron.

La FIG. 14B muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB22M γ 2 EH1.

La FIG. 15A muestra el análisis de masas intactas de la variante IAB22 γ 2 EH2. La proteína se separó en condiciones de fase inversa. El panel superior muestra el escaneo del rango de masa completo. La región de masa de tamaño completo ampliada enfatiza la presencia de la proteína intacta, es decir, unida por puente disulfuro (panel central), mientras que la región de media molécula ampliada mostró que esencialmente no hay media molécula presente (panel inferior).

La FIG. 15B muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones de la variante IAB22M γ 2 EH2.

La FIG. 16B muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB22M γ 1 EH1.

La FIG. 16C muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB22M γ 2 NH1.

La FIG. 16D muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB22M γ 2 NH2.

La FIG. 19 es una ilustración de algunas variantes de bisagra enumeradas en la Tabla 3 (γ 1 EH1 superior, γ 1 EH3 central, γ 1 EH4 inferior).

La FIG. 20A muestra un gráfico que resume el porcentaje de medias moléculas presentes en diferentes variantes de bisagra para IAB2M según se determina por espectrometría de masas.

La FIG. 20B muestra un gráfico que resume el porcentaje de medias moléculas presentes en las diferentes variantes de bisagra para IAB22M según se determina por espectrometría de masas.

La FIG. 20C muestra información de la secuencia de proteína de algunas realizaciones de IAB22M γ 1 EH3.

La FIG. 20D muestra información de la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB22M γ 1 EH5.

La FIG. 20E muestra información de la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB22M γ 3/ γ 1 EH6.

La FIG. 20F muestra información de la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB22M γ 3/ γ 1 EH7.

La FIG. 20G muestra información de la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB22M γ 3/ γ 1 EH8.

La FIG. 21A muestra una imagen del análisis SDS-PAGE no reducido (panel izquierdo) de las variantes de bisagra de Mb de IAB2M y el porcentaje de medias moléculas cuantificado por densitometría (panel derecho).

La FIG. 21B muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB2M γ 1 EH5.

La FIG. 21C muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB2M γ 3/ γ 1 EH6.

La FIG. 21D muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB2M γ 3/ γ 1 EH7.

La FIG. 21E muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB2M γ 3/ γ 1 EH8.

La FIG. 22A muestra una imagen del análisis SDS-PAGE no reducido (panel izquierdo) de las variantes de bisagra de Mb de IAB22M y el porcentaje de medias moléculas cuantificado por densitometría (panel derecho).

La FIG. 22B muestra información de secuencia de proteína para algunas realizaciones IAB22M γ 1 EH2.

La FIG. 23 muestra el análisis de masas intactas de la variante IAB22M γ 1 EH1. El panel superior muestra el cromatograma de iones totales. El panel central muestra las masas intactas deconvolucionadas que confirman la presencia de medias moléculas y el panel inferior muestra las masas de tamaño completo que se identificaron.

La FIG. 24 muestra el análisis de masas intactas de la variante IAB22M γ 1 EH3. La proteína se separó en condiciones de fase inversa. El panel superior muestra el escaneo del rango de masas completo. La región de masa de tamaño completo ampliada enfatiza la presencia de la proteína intacta (panel central). La región de media molécula ampliada muestra que esencialmente no hay medias moléculas (panel inferior).

Las FIGS. 25A y 25B muestran análisis de masas intactas de variantes de bisagra IAB22M γ 2. La FIG. 25A muestra el cromatograma de iones totales de la variante IAB22M γ 2 EH1 (FIG. 14B) en condiciones de fase inversa (panel superior). El panel central muestra las masas intactas deconvolucionadas que confirman la presencia de medias moléculas y el panel inferior muestra las masas de tamaño completo que se identificaron. Obsérvese que la heterogeneidad se debe al recorte de la lisina terminal. La FIG. 25B muestra un escaneo de rango completo deconvolucionado (panel superior) de la variante IAB22M γ 2 EH2 (FIG. 15B) identifica la única especie con m/z de 79053.1 Da. El peso molecular a tamaño completo ampliado se muestra en el panel central y la media molécula es de baja abundancia y está justo por encima del nivel de ruido (panel inferior).

La FIG. 26 muestra las curvas de unión y los valores de unión EC50 de las variantes de bisagra manipuladas de IAB2M determinadas por FACS usando células C4-2 XCL.

La FIG. 27 muestra las curvas de unión y los valores de unión EC50 de las variantes de bisagra manipuladas con IAB22M determinados por FACS usando células HPB-ALL.

La FIG. 28A muestra una imagen del análisis SDS-PAGE no reducido de las variantes de bisagra de Mb IAB20M (panel izquierdo) y un porcentaje de medias moléculas cuantificado por densitometría (panel derecho).

La FIG. 28B muestra información sobre la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB20M γ 1 EH1.

La FIG. 28C muestra información sobre la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB20M γ 1 EH3.

La FIG. 28D muestra información sobre la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB20M γ 1 EH2.

La FIG. 28E muestra información sobre la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB20M γ 1 EH5.

La FIG. 29A muestra una imagen del análisis SDS-PAGE no reducido de las variantes de bisagra de Mb IAB 1M (panel izquierdo) y el porcentaje de medias moléculas cuantificado por densitometría (panel derecho).

La FIG. 29B muestra información sobre la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB1M γ1 EH1.
 La FIG. 29C muestra información sobre la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB1M γ2 EH2.
 La FIG. 29D muestra información sobre la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB1M γ1 EH3.
 La FIG. 32 muestra información sobre la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB20M γ2 EH2.
 5 La FIG. 33 muestra información sobre la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB25M-γ2 EH2.
 La FIG. 34A muestra la secuencia de ADN que codifica algunas realizaciones del Mb IAB2M.
 La FIG. 34B muestra la secuencia de ADN que codifica algunas realizaciones del Mb IAB2M.
 La FIG. 34C muestra la secuencia de ADN que codifica algunas realizaciones del Mb IAB2M.
 La FIG. 34D muestra la secuencia de ADN que codifica algunas realizaciones del Mb IAB2M.
 10 La FIG. 34E muestra la secuencia de ADN que codifica algunas realizaciones del Mb IAB2M.
 La FIG. 34F muestra la secuencia de ADN que codifica algunas realizaciones del Mb IAB2M.
 La FIG. 35A muestra información sobre la secuencia de proteína de las variantes de bisagra de Mb IAB2M.
 La FIG. 35B muestra información sobre la secuencia de proteína de las variantes de bisagra de Mb IAB2M.
 La FIG. 35C muestra información sobre la secuencia de proteína de las variantes de bisagra de Mb IAB2M.
 15 La FIG. 36A muestra información de secuencia de proteína de los dominios VL y VH de Mb con diferentes especificidades antigénicas.
 La FIG. 36B muestra información de secuencia de proteína de los dominios VL y VH de Mb con diferentes especificidades antigénicas.
 La FIG. 36C muestra información de secuencia de proteína de los dominios VL y VH de Mb con diferentes especificidades antigénicas.
 20 La FIG. 36D muestra información de secuencia de proteína de los dominios VL y VH de Mb con diferentes especificidades antigénicas.
 La FIG. 36E muestra información de secuencia de proteína de los dominios VL y VH de Mb con diferentes especificidades antigénicas.
 25 La FIG. 37 muestra información sobre la secuencia de proteína de varias realizaciones de secuencias conectoras.
 La FIG. 38 muestra información de secuencia de proteína de varias realizaciones de regiones bisagra.
 La FIG. 39 muestra información de secuencia de proteína de varias realizaciones de dominios C_H3.
 La FIG. 40 muestra un alineamiento de las secuencias de proteínas de una realización de cada una de IAB22M γ1 EH1(M1) e IAB22M γ1 EH3(M1). Las diferencias de secuencia se muestran en recuadros.
 30 La FIG. 41 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB22M γ1 EH3(M1). En los recuadros se muestran las secuencias señal, CDR, conectora y bisagra.
 La FIG. 42 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB22M γ1 EH5(M1).
 La FIG. 43 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB22M γ1 EH7(M1).
 La FIG. 44 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB22M γ1 EH8(M1).
 35 La FIG. 45 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB22M γ2 EH2(M1).
 La FIG. 46 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB22M γ2 EH2(M1) con polimorfismo VH-K67R.
 La FIG. 47 muestra un alineamiento de secuencias de proteínas de una realización de cada una de IAB2M γ1 EH1(M2) y IAB2M γ1 EH3(M2). Las diferencias de secuencias se muestran en los recuadros.
 40 La FIG. 48 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB2M γ1 EH3(M2). En los recuadros se muestran las secuencias señal, CDR, conectora y bisagra.
 La FIG. 49 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una realización de IAB2M γ1 EH3 (M2) (G1m1).
 La FIG. 50 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB2M γ1 EH5(M2).
 La FIG. 51 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB2M γ1 EH7(M2).
 45 La FIG. 52 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB2M γ1 EH8(M2).
 La FIG. 53 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB2M γ1 EH3(M1).
 La FIG. 54 muestra un alineamiento de secuencias de proteínas de una realización de cada una de IAB20M γ1 EH1 (M2) y IAB20M γ1 EH3 (M2) con polimorfismos VL-Q79E, V83E; VH-Q1E, Q6E. Las diferencias de secuencia se muestran en los recuadros.
 50 La FIG. 55 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB20M γ1 EH3(M2) con polimorfismos VL-Q79E, V83E; VH-Q1E, Q6E. En los recuadros se muestran las secuencias señal, CDR, conectora y bisagra.
 La FIG. 56 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB20M γ1 EH3(M2).
 La FIG. 57 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB20M γ1 EH3 (M2) con polimorfismos VL-A9D, T10S, S12A, P15L, L21I, S22N; VH-Q1E, Q6E.
 55 La FIG. 58 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB20M γ1 EH5 (M2) con polimorfismos VL-Q79E, V83E; VH-Q1E, Q6E.
 La FIG. 59 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB20M γ1 EH5 (M2) con polimorfismos VL-A9D, T10S, S12A, P15L, L21I, S22N; VH-Q1E, Q6E.
 60 La FIG. 60 muestra un alineamiento de secuencias de proteínas de una realización de IAB1M γ1 EH1(M1) y IAB1M γ1 EH3 (M1). Las diferencias de secuencias se muestran en los recuadros.
 La FIG. 61 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB1M γ1 EH3(M1). En los recuadros se muestran las secuencias de señal, CDR, conector y bisagra.
 La FIG. 62 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB1M γ2 EH2 (M1).
 65 La FIG. 63 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB1M γ1 EH5 (M1).

La FIG. 64 muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB1M γ 1 EH7 (M1).
 La FIG. 65A muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB1My1 EH8(M1).
 La FIG. 65B muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB25M γ 2 NH(M1).
 La FIG. 65C muestra la secuencia de ADN y proteína traducida de una variante de IAB25M γ 2 EH(M1).
 La FIG. 66 muestra la secuencia de proteína de una realización del dominio VH de IAB22M.
 La FIG. 67 muestra la secuencia de proteína de algunas realizaciones del dominio VL de IAB20.
 La FIG. 68 muestra la secuencia de proteína de una realización del dominio VH de IAB20.
 La FIG. 69 muestra la secuencia de proteína de algunas realizaciones de los dominios VL y VH anti-CD3.
 La FIG. 70 muestra la secuencia de proteína de una variante de PSMA (Antígeno de membrana específico de la
 próstata) también conocido como glutamato carboxipeptidasa 2 de *Homo sapiens*.
 La FIG. 71 muestra la secuencia de proteína de una variante de PSCA (Antígeno de células madre de la próstata)
 de *Homo sapiens*.
 La FIG. 72 muestra la secuencia de proteína de una variante de la glicoproteína del trofoblasto oncofetal 5T4 de
Homo sapiens.
 La FIG. 73 muestra la secuencia de proteína de una variante de la cadena alfa de la glicoproteína de superficie de
 células T CD8 de *Homo sapiens*.
 La FIG. 74 muestra la secuencia de proteína de una variante de la cadena beta de la glicoproteína de superficie
 de células T CD8 de *Homo sapiens*.
 La FIG. 75 muestra la secuencia de proteína de una variante de la cadena delta de la glicoproteína de superficie
 de células T CD3 del *Homo sapiens*.
 La FIG. 76 muestra la secuencia de proteína de una variante de la cadena gamma de la glicoproteína de superficie
 de células T CD3 de *Homo sapiens*.
 La FIG. 77 muestra la secuencia de proteína de una variante de la cadena épsilon de la glicoproteína de superficie
 de células T CD3 de *Homo sapiens*.
 La FIG. 78 muestra la secuencia de proteína de una variante de la cadena zeta de la glicoproteína de superficie
 de células T CD3 de *Homo sapiens*.
 La FIG. 79 muestra información sobre la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB25M- γ 2 EH2.
 La FIG. 80 muestra información sobre la secuencia de proteína para algunas realizaciones de IAB20M- γ 2 EH2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente se describen componentes para constructos de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, como minicuerpos, que se unen a una molécula diana. En algunas realizaciones, estos componentes son nuevas secuencias bisagra y/o secuencias asociadas con y/o parte de la secuencia bisagra. Estas secuencias bisagra pueden proporcionar diversos beneficios. También se proporcionan en la presente los constructos de unión a antígeno (como anticuerpos, minicuerpos, etc.) que incluyen una o más de las secuencias bisagra o subsecuencias proporcionadas en la presente.

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Cualquier referencia a otras realizaciones se hace únicamente con propósitos ilustrativos.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno pueden ser útiles para dirigir agentes terapéuticos a células que expresan la molécula diana. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para detectar la presencia o ausencia de una molécula diana (o "diana") usando constructos de unión a antígeno (incluyendo anticuerpos y constructos como minicuerpos). En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para usar los constructos de unión a antígeno con propósitos terapéuticos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos scFv y minicuerpos pueden tener propiedades farmacocinéticas superiores para una imagenología de diagnóstico más rápida, a la vez que se mantienen la especificidad y afinidad de unión del anticuerpo parental. La tecnología actual utiliza imagenología con los anticuerpos de longitud completa que a menudo requiere tiempos significativamente más largos (~7-8 días después de la inyección) para producir imágenes de alto contraste debido a la lenta depuración sérica del anticuerpo intacto. Algunas realizaciones de los minicuerpos proporcionados en la presente permiten la imagenología el mismo día o al día siguiente. La imagenología el mismo día o al día siguiente también proporciona una solución logística al problema al que se enfrentan muchos pacientes que viajan grandes distancias para recibir tratamiento/diagnóstico, ya que la duración de las estancias de viaje o la necesidad de volver una semana más tarde se eliminarían al obtener imágenes con minicuerpos frente a anticuerpos intactos.

Como se detalla a continuación, en algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno son para diagnóstico. Cuando se marcan con un radionúclido apropiado (por ejemplo, el emisor de positrones Yodo-124, Cobre-64, Flúor-18, Galio-68 y/o Circonio-89 para imagenología PET) o fluoróforo (para imagenología fluorescente), los

fragmentos de anticuerpo pueden usarse para imagenología preclínica como se muestra en la presente y para imagenología clínica en pacientes. Estos constructos de unión a antígeno también pueden usarse como agentes potenciales de imagenología SPECT simplemente cambiando el radiomarcador por radionúclidos emisores de fotón único como el Indio-111, el Yodo-123 y el Luticio-177.

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno pueden ser agentes de imagenología clínica (PET/SPECT) en humanos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno pueden usarse para la detección diagnóstica dirigida de estos trastornos. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno puede usarse como agente terapéutico.

Definiciones y varias realizaciones

El término "bisagra" denota por lo menos una parte de una región bisagra para un constructo de unión a antígeno, como un anticuerpo o un minicuerpo. Una región bisagra puede incluir una combinación de las regiones bisagra superior, bisagra central (o media) y bisagra inferior. En algunas realizaciones, la bisagra se define de acuerdo con cualquiera de las definiciones de bisagra de anticuerpo. Los anticuerpos nativos IgG1, IgG2 e IgG4 tienen regiones bisagra que tienen 12-15 aminoácidos. IgG3 tiene una región bisagra extendida, que tiene 62 aminoácidos, incluyendo 21 prolina y 11 cisteínas. La región bisagra funcional de los anticuerpos de origen natural, deducida a partir de estudios cristalográficos, se extiende desde los residuos de aminoácidos 216-237 de la cadena H de IgG1 (numeración UE; ref. 12) e incluye un pequeño segmento de extremo N terminal del dominio CH2 en la bisagra inferior, siendo la bisagra inferior el extremo N terminal del dominio CH2. La bisagra puede dividirse en tres regiones: la "bisagra superior", la "central" y la "bisagra inferior".

El término "artificial" o "no natural" cuando se modifica una bisagra (o una subparte de la misma) denota que la secuencia en cuestión no está presente, en el estado indicado, en la naturaleza. En el presente contexto, las bisagras se han alterado con respecto a su estado nativo en, de tal manera que sus secuencias ya no son las que se encuentran en los anticuerpos de tipo salvaje. Como apreciarán los expertos en la técnica, los minicuerpos no se encuentran de forma natural en la naturaleza y, por lo tanto, cualquier constructo que sea un constructo de minicuerpo tampoco se encuentra en la naturaleza. Esto también se aplica a por lo menos algunos de los constructos que se encuentran en y/o incorporan las secuencias de cualquiera de las tablas de secuencias de bisagra proporcionadas en la presente (por ejemplo, la Tabla 0.2). En algunas realizaciones, cualquiera de las subpartes de bisagras o secuencias de bisagra completas de la Tabla 0.1 pueden ser secuencias de bisagra artificiales, siempre que la secuencia (o combinación resultante para la bisagra) no se encuentre en la naturaleza.

El término "región bisagra completa" o "región bisagra entera" denota la presencia de las regiones bisagra superior, central e inferior completas como un único constructo. Las regiones superior, central e inferior pueden situarse inmediatamente adyacentes entre sí, o pueden añadirse residuos adicionales entre ellas, o N- o C-terminales a las regiones. En algunas realizaciones, la bisagra inferior nativa puede sustituirse por una secuencia de extensión. En algunas realizaciones, puede combinarse una bisagra inferior nativa con la secuencia de extensión. En algunas realizaciones, puede añadirse una extensión u otro conjunto de secuencias después de las secuencias superior y/o central.

La frase "región bisagra efectiva" denota que una cantidad adecuada de parte de por lo menos una de las regiones bisagra superior, central e inferior está presente para permitir que la región bisagra sea efectiva para su propósito previsto. Por tanto, la frase abarca variantes de regiones bisagra y fragmentos de las varias regiones bisagra. En algunas realizaciones, la función de la región bisagra es una o más de las siguientes: enlazar el scFv con el dominio CH3, proporcionar flexibilidad y espacio para que los dos scFv se unan a la diana adecuadamente, enlazar dos medias moléculas, para proporcionar estabilidad global a la molécula, y/o proporcionar un sitio para la conjugación específica del sitio debido a su exposición al solvente. En algunas realizaciones, la bisagra debe estar cerca del natural para reducir la inmunogenicidad potencial. En algunas realizaciones, la bisagra superior proporciona flexibilidad al scFv (comienza en el residuo 216 en las IgG nativas), la bisagra media proporciona estabilidad, y la bisagra inferior media la flexibilidad para CH3 (comienza en el residuo 231 en las IgG nativas).

El término "bisagra superior" denota la primera parte de la bisagra que comienza en el extremo del scFv. En la Tabla 0.1 pueden encontrarse ejemplos de regiones bisagra superiores. La bisagra superior incluye los aminoácidos desde el extremo del scFv hasta, pero sin incluir, el primer residuo de cisteína en la bisagra central como se muestra en la Tabla 0.1. Como en el caso anterior, el término "bisagra superior efectiva" denota que hay suficiente secuencia para permitir que la sección funcione como bisagra superior; el término abarca variantes funcionales y fragmentos de la sección de bisagra designada.

El término "bisagra central" denota la segunda parte de la región bisagra que es C-terminal a la bisagra superior. En la Tabla 0.1 pueden encontrarse ejemplos de regiones bisagra centrales. La bisagra central contiene los puentes disulfuro entre cadenas y un alto contenido de prolina. Como en el caso anterior, el término "bisagra central efectiva" denota que hay suficiente secuencia para permitir que la sección funcione como bisagra central; el término abarca variantes funcionales y fragmentos de la sección de bisagra designada.

El término "bisagra inferior" denota la tercera parte de la región bisagra que es C-terminal a la bisagra central. En la Tabla 0.1 pueden encontrarse ejemplos de regiones bisagra inferiores. En el contexto de un minicuerpo o fragmento de anticuerpo, la bisagra inferior conecta con el dominio C_H3 de Mb. Como en el caso anterior, el término "bisagra inferior efectiva" denota que hay suficiente secuencia para permitir que la sección funcione como una bisagra inferior; el término abarca variantes funcionales y fragmentos de la sección de bisagra designada. El término "bisagra inferior", como se usa en la presente, puede englobar varias secuencias de aminoácidos, incluyendo secuencias bisagra inferiores de IgG de origen natural y secuencias de extensión artificial en lugar de unas y otras o una combinación de las mismas proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, las varias extensiones pueden considerarse una región bisagra inferior en su totalidad o una sustitución.

El término "tratar" o "tratamiento" de una afección puede referirse a prevenir la afección, ralentizar la aparición y/o la velocidad de desarrollo de la afección, reducir el riesgo de desarrollar la afección, prevenir y/o retrasar el desarrollo de los síntomas asociados a la afección, reducir o poner fin a los síntomas asociados con la afección, generar una regresión completa o parcial de la afección, o alguna combinación de los mismos. El término "prevenir" no requiere la prohibición absoluta del trastorno o enfermedad.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "dosis terapéuticamente eficaz" es una cantidad que produce un efecto terapéutico deseado en un sujeto, como prevenir, tratar una afección diana, retrasar la aparición del trastorno y/o los síntomas, y/o aliviar los síntomas asociados con la afección. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores, que incluyen las características del compuesto terapéutico (incluyendo la actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), el estado fisiológico del sujeto (incluyendo la edad, sexo, tipo y estadio de la enfermedad, estado físico general, capacidad de respuesta a una dosificación dada y tipo de medicación), la naturaleza del portador o portadores farmacéuticamente aceptables de la formulación y/o la vía de administración. Un experto en las técnicas clínicas y farmacológicas podrá determinar una cantidad terapéuticamente eficaz mediante experimentación rutinaria, por ejemplo monitorizando la respuesta de un sujeto a la administración de un compuesto y ajustando la dosificación en consecuencia, dada la presente divulgación. Para pautas adicionales, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21^a Edición, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2005.

El término "constructo de unión a antígeno" incluye todas las variedades de anticuerpos, incluyendo los fragmentos de unión de los mismos. Se incluyen además constructos que incluyen 1, 2, 3, 4, 5, y/o 6 CDR. En algunas realizaciones, pueden proporcionarse scFv en tándem, que pueden proporcionar dos brazos con unión bivalente. En algunas realizaciones, estas CDR pueden distribuirse entre sus regiones marco apropiadas en un anticuerpo tradicional. En algunas realizaciones, las CDR pueden estar contenidas dentro de una región variable de cadena pesada y/o ligera. En algunas realizaciones, las CDR pueden estar dentro de una cadena pesada y/o una cadena ligera. En algunas realizaciones, las CDR pueden estar dentro de una única cadena peptídica. A menos que se indique lo contrario en la presente, los constructos de unión a antígeno descritos en la presente se unen a la molécula diana indicada. El término "diana" o "molécula diana" denota la proteína a la que se une el constructo de unión a antígeno. En la técnica se conocen ejemplos de proteínas diana, e incluyen, por ejemplo, PSMA (como FOLH1) (FIG. 70; SEQ ID NO: 131), PSCA (FIG. 71; SEQ ID NO: 132), 5T4 (como TPBG) (FIG. 72; SEQ ID NO: 133), CD8 (como la cadena α) (FIG. 73; SEQ ID NO: 134), CD8 (como la cadena β) (FIG. 74; SEQ ID NO: 135), CD3 (como la cadena δ) (FIG. 75; SEQ ID NO: 136), CD3 (como la cadena γ) (FIG. 76; SEQ ID NO: 137), CD3 (como la cadena ϵ) (FIG. 77; SEQ ID NO: 138), CD3 (como la cadena ζ) (FIG. 78; SEQ ID NO: 139).

El término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, formas de inmunoglobulinas manipuladas genéticamente o modificadas de otro modo, como intracuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpos, scFv y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, etc.). El término "anticuerpo" incluye scFv y minicuerpos. Por lo tanto, todas y cada una de las realizaciones proporcionadas en la presente con respecto a los "anticuerpos" también se contemplan como realizaciones de scFv y/o minicuerpos, a menos que se indique explícitamente lo contrario. El término "anticuerpo" incluye un polipéptido de la familia de las inmunoglobulinas o un polipéptido que comprende fragmentos de una inmunoglobulina capaz de unirse de manera no covalente, reversible y específica a un antígeno correspondiente. Una unidad estructural de anticuerpo ejemplar comprende un tetrámero. En algunas realizaciones, un anticuerpo de longitud completa puede estar compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par teniendo una cadena "ligera" y otra "pesada" (conectadas mediante un enlace disulfuro). Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon, bisagra y mu, así como los innumerables genes de región variable de inmunoglobulina. Para las cadenas de longitud completa, las cadenas ligeras se clasifican o como kappa o como lambda. Para cadenas de longitud completa, las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 aminoácidos o más, responsable principalmente del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas regiones de las cadenas ligera y pesada, respectivamente. Como se usa en esta solicitud, un "anticuerpo" abarca todas las variaciones de anticuerpos y fragmentos de los mismos. Por tanto, dentro del alcance de este concepto se encuentran los

anticuerpos de longitud completa, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla (scFv), Fab, Fab', y versiones multiméricas de estos fragmentos (por ejemplo, F(ab')₂) con la misma especificidad de unión. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a una diana deseada.

Los términos "dominios determinantes de la complementariedad" o "regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") se refieren indistintamente a las regiones hipervariables de V_L y V_H. Las CDR son el sitio de unión a la molécula diana de las cadenas de anticuerpos que albergan especificidad para dicha molécula diana. En algunas realizaciones, hay tres CDR (CDR1-3, numeradas secuencialmente desde el extremo N-terminal) en cada V_L y/o V_H, que constituyen aproximadamente el 15-20% de los dominios variables. Las CDR son estructuralmente complementarias al epítipo de la molécula diana y, por tanto, son directamente responsables de la especificidad de unión. Los tramos restantes de la V_L o V_H, las denominadas regiones marco (FR), muestran menos variación en la secuencia de aminoácidos (Kuby, Immunology, 4ª ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co. W.H. Freeman & Co., Nueva York, 2000).

Las posiciones de las CDR y las regiones marco pueden determinarse usando varias definiciones bien conocidas en la técnica, por ejemplo, Kabat (Wu, T. T. et al., "An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity," J. Exp. Med., Vol. 132, No. 2, págs. 211-250, 1970; Kabat, E. A. et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5ª Ed., Publicación del NIH N° 91-3242, Bethesda, MD, 1991; Chothia C. et al., "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins," J. Mol. Biol., Vol. 196, No. 4, págs. 901-917, 1987; Chothia C. et al., "Conformations of immunoglobulin hypervariable regions," Nature, Vol. 342, No. 6252, págs. 877-883, 1989; Chothia C. et al., "Structural repertoire of the human VH segments," J. Mol. Biol., Vol. 227, No. 3, págs. 799-817, 1992; Al-Lazikani B. et al., "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins," J. Mol. Biol., Vol. 273, No. 4, págs. 927-748, 1997), ImMunoGeneTics database (IMGT) (en la web mundial en imgt.org /) (Giudicelli, V. et al., "IMGT/LIGM-DB, the IMGT® comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences," Nucleic Acids Res, Vol. 34 (Database Issue), págs. D781-D784, 2006; Lefranc, M. P. et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev. Comp. Immunol., Vol. 27, No. 1, págs. 55-77, 2003; Brochet, X. et al., "IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis," Nucleic Acids Res, Vol. 36 (Web Server Issue), págs. W503-508, 2008; AbM (Martin, A. C. et al., "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm," Proc. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 86, No. 23, págs. 9268-9272, 1989); la definición de contacto (MacCallum, R. M. et al., "Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol., Vol. 262, No. 5, págs. 732-745, 1996), y/o la herramienta automática de modelado y análisis (Honegger, A. et al., Accesible en Internet en bioc.uzh.ch/plueckthun/antibody/Numbering/).

Los términos "determinante de especificidad de unión" o "BSD" se refieren indistintamente a la secuencia mínima de aminoácidos contigua o no contigua dentro de una región determinante de complementariedad necesaria para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo. Un determinante mínimo de especificidad de unión puede estar dentro de una o más secuencias CDR. En algunas realizaciones, los determinantes mínimos de especificidad de unión residen dentro de (es decir, están determinados únicamente por) una parte o la longitud completa de las secuencias CDR3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. En algunas realizaciones, la CDR3 de la región variable de la cadena pesada es suficiente para la especificidad del constructo de unión al antígeno.

Una "cadena ligera variable de anticuerpo" o una "cadena pesada variable de anticuerpo", como se usan en la presente, se refiere a un polipéptido que comprende la V_L o la V_H, respectivamente. La V_L endógena está codificada por los segmentos génicos V (variable) y J (de unión), y la V_H endógena por V, D (diversidad) y J. Cada una de las V_L o V_H incluye las CDR así como las regiones marco. En esta solicitud, las cadenas ligeras variables de anticuerpos y/o las cadenas pesadas variables de anticuerpos pueden, de vez en cuando, denominarse colectivamente "cadenas de anticuerpos". Estos términos abarcan cadenas de anticuerpo que contienen mutaciones que no alteran la estructura básica de la V_L o la V_H, como reconocerá fácilmente un experto en la técnica. En algunas realizaciones, se contemplan cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa. En algunas realizaciones, sólo se contempla la presencia de la región variable de las cadenas pesadas y/o ligeras.

Los anticuerpos pueden existir como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos producidos por digestión con varias peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro de la región bisagra para producir F(ab')₂, un dímero de Fab' que a su vez es una cadena ligera (V_L-C_L) unida a V_H-C_H1 por un enlace disulfuro. El F(ab')₂ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de este modo el dímero F(ab')₂ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es un Fab con parte de la región bisagra. (Paul, W. E., "Fundamental Immunology," 3ª Ed., New York: Raven Press, 1993). Aunque varios fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos pueden sintetizarse *de novo* químicamente o usando metodología de ADN recombinante. Así, el término "anticuerpo", como se usa en la presente, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos, o aquellos sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla) o aquellos identificados usando bibliotecas de visualización de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty, J. et al., "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains," Nature,

Vol. 348, No. 66301, págs. 552-554, 1990).

Para la preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales, puede usarse cualquier técnica conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler, G. et al., "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, Vol. 256, No. 5517, págs. 495-497, 1975; Kozbor, D. et al., "The production of monoclonal antibodies from human lymphocytes," *Immunology Today*, Vol. 4, N° 3, págs. 72-79, 1983; Cole, et al., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy," Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96, 1985; Wang, S., "Advances in the production of human monoclonal antibodies," *Antibody Technology Journal*, Vol. 1, págs. 1-4, 2011; Sharon, J. et al., "Recombinant polyclonal antibodies for cancer therapy," *J. Cell Biochem.*, Vol. 96, No. 2, págs. 305-313, 2005;; Haurum, J. S., "Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics?", *Drug Discov. Today*, Vol. 11, N° 13-14, págs. 655-660, 2006). Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de Estados Unidos N° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos contra polipéptidos de la presente invención. Para expresar anticuerpos monoclonales totalmente humanos también pueden usarse ratones transgénicos, u otros organismos como otros mamíferos,. Alternativamente, puede usarse la tecnología de presentación en fagos para identificar enlaces de alta afinidad con antígenos seleccionados (véase, por ejemplo, McCafferty et al., supra; Marks, J. D. et al., "By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling," *Biotechnology (N. Y.)*, Vol. 10, No. 7, págs. 779-783, 1992).

Los métodos para humanizar o primatizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo residuos de importación, que típicamente se toman de un dominio variable de importación. En algunas realizaciones, pueden emplearse los términos secuencias "donante" y "aceptora". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (véase, por ejemplo, Jones, P. T. et al., "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse," *Nature*, Vol. 321, No. 6069, págs. 522-525, 1986; Riechmann, L. et al., "Reshaping human antibodies for therapy," *Nature*, Vol. 332, No. 6162, págs. 323-327, 1988; Verhoeyen, M. et al., "Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity," *Science*, Vol. 239, No. 4847, págs. 1534-1536, 1988; Presta, L. G., "Antibody engineering," *Curr. Struct. Biol.*, Vol. 2, No. 4, págs. 593-596, 1992), mediante la sustitución de CDR o secuencias de CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región determinante de la complementariedad ("CDR") y posiblemente algunos residuos del marco ("FR") se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, sustituye o intercambia de tal manera que el sitio de unión al antígeno (región variable) se enlaza a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o a una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento y fármaco; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, sustituye o intercambia con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

Los anticuerpos incluyen además una o más cadenas de inmunoglobulina que se conjugan químicamente con otras proteínas o se expresan como proteínas de fusión con otras proteínas. También incluye anticuerpos biespecíficos. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes.

Otros fragmentos de unión a antígeno o porciones de anticuerpo de la invención incluyen anticuerpos scFv biespecíficos en los que la molécula de anticuerpo reconoce dos epítomos diferentes, dominios de unión únicos (sdAb o nanocuerpos) y minicuerpos.

El término "fragmento de anticuerpo" incluye, entre otros, uno o más fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos solos o en combinación con otras moléculas incluyendo, entre otros, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG (IgG reducida), fragmentos scFv, fragmentos de dominio único (nanocuerpos), peptidocuerpos, minicuerpos. El término "scFv" se refiere a un anticuerpo Fv ("fragmento variable") de cadena sencilla en el que los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo tradicional de dos cadenas se han unido para formar una cadena.

Un portador farmacéuticamente aceptable puede ser un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable que está implicado en el transporte de un compuesto de interés de un tejido, órgano o parte del cuerpo a otro tejido, órgano o parte del cuerpo. Por ejemplo, el portador puede ser una carga, diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulación líquidos o sólidos, o una combinación de los mismos. Cada componente del portador es "farmacéuticamente aceptable" en el sentido de que debe ser compatible con los demás ingredientes de la formulación. También debe ser adecuado para el contacto con cualquier tejido, órgano o parte del cuerpo que pueda encontrar, lo que significa que no debe conllevar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad o cualquier otra complicación que supere excesivamente sus beneficios terapéuticos. Las composiciones farmacéuticas descritas

en la presente pueden administrarse por cualquier vía de administración adecuada. Una vía de administración puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, incluyendo pero no limitadas a, aerosol, enteral, nasal, oftálmica, oral, parenteral, rectal, transdérmica (por ejemplo, crema o pomada tópica, parche) o vaginal. La administración "transdérmica" puede realizarse usando una crema o pomada tópica o mediante un parche transdérmico. "Parenteral" se refiere a una vía de administración que generalmente se asocia con la inyección, incluyendo infraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosa o transtraqueal. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno puede administrarse intraoperatoriamente como una administración local durante una intervención o resección.

El término "trastorno dependiente de la molécula diana" o "trastorno asociado a la molécula diana" incluye cualquier trastorno en el que la molécula diana desempeña un papel en el propio trastorno. En algunas realizaciones, esto denota sobreexpresión de la molécula diana. En algunas realizaciones, los trastornos pueden incluir cualquiera de los trastornos analizados en la presente. En algunas realizaciones, el trastorno puede ser cualquiera para el que haya una molécula diana que pueda ser objeto de unión, cuya unión dará como resultado la detección y/o tratamiento del trastorno. Sin limitación, la molécula diana puede ser CD8, CD3, 5T4, PSMA y/o PSCA, por ejemplo.

Un minicuerpo es un formato de anticuerpo que tiene un peso molecular menor que el anticuerpo de longitud completa, pero que mantiene la propiedad de unión bivalente contra un antígeno. Debido a su menor tamaño, la ausencia del dominio CH2 que se une a los receptores Fc-gamma y FcRN, y la ausencia de glicosilación, el minicuerpo tiene una depuración más rápida del sistema y una penetración potencialmente mejorada cuando se dirige al tejido tumoral. Gracias a la capacidad de focalización fuerte combinada con la depuración rápida, el minicuerpo es ventajoso para la imagenología de diagnóstico y la administración de cargas radiactivas para las que los tiempos de circulación prolongados pueden dar como resultado una dosificación o dosimetría adversas para el paciente. En algunas realizaciones, también puede ser ventajoso para la administración de una carga útil citotóxica debido a las características mencionadas con anterioridad, como la penetración en el tumor y una depuración más rápida. Un "minicuerpo", tal como se describe en la presente, abarca un homodímero, en donde cada monómero es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) unido a un dominio C_H3 de IgG humana por una secuencia bisagra. En algunas realizaciones, un minicuerpo es un homodímero bivalente o biespecífico unido covalentemente de ~80 kDa. En algunas realizaciones, cada monómero (media molécula) está compuesto de un dominio variable pesado (V_H) enlazado al dominio variable ligero (V_L) correspondiente por una secuencia conectora rica en Gly-Ser de aproximadamente 15-18 aminoácidos.

En algunas realizaciones, cada fragmento variable de cadena sencilla (scFv) está enlazado a un dominio C_H3 de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano por una secuencia bisagra.

En algunas realizaciones, una secuencia bisagra inferior/extensión puede ser una bisagra inferior nativa de IgG1, 2, 3 o 4, y/o (G₃)S_n o (G₄)S_n (n puede ser cualquier número de S; en algunas realizaciones es 1 o 2) y/o ninguna bisagra inferior y/o cualquier combinación de aminoácidos (no tienen que ser de G y S). En algunas realizaciones, la secuencia de bisagra/extensión inferior puede comprender GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59).

En algunas realizaciones, un conector puede ser cualquiera que funcione. En algunas realizaciones, una secuencia conectora puede incluir un motivo que es (G₃)S_n o (G₄)S_n (n puede ser cualquier número de S; en algunas realizaciones es 1 o 2). En algunas realizaciones, el conector puede comprender GSTSGGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO: 62).

La frase "se une específicamente (o selectivamente)", cuando se usa en el contexto de describir la interacción entre un antígeno, por ejemplo, una proteína, a un anticuerpo o agente de unión derivado de anticuerpo, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia del antígeno en una población heterogénea de proteínas y otros agentes biológicos, por ejemplo, en una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de sangre, suero, plasma o tejido. Así, en algunas realizaciones, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos o agentes de unión con una especificidad de unión particular se unen a un antígeno concreto por lo menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo o agente de unión en tales condiciones puede requerir que el anticuerpo o agente haya sido seleccionado por su especificidad para una proteína en particular. Para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular pueden usarse una variedad de formatos de inmunoensayo. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan habitualmente para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow, E. & Lane D., "Using Antibodies, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998, para una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden usarse para determinar la inmunorreactividad específica). Típicamente, una reacción de unión específica o selectiva producirá una señal por lo menos dos veces superior a la señal de fondo y, más típicamente, por lo menos de 10 a 100 veces superior al fondo.

El término "constante de disociación de equilibrio (K_D, M)" se refiere a la constante de velocidad de disociación (k_d, tiempo⁻¹) dividida por la constante de velocidad de asociación (k_a, tiempo⁻¹ M⁻¹). Las constantes de disociación de

equilibrio pueden medirse usando cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención tendrán generalmente una constante de disociación de equilibrio de menos de aproximadamente 10^{-7} o 10^{-8} M, por ejemplo, menos de aproximadamente 10^{-9} M o 10^{-10} M, en algunas realizaciones, menos de aproximadamente 10^{-11} M, 10^{-12} M, o 10^{-13} M.

El término "aislado", cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, denota que el ácido nucleico o proteína está esencialmente libre de otros componentes celulares con los que está asociado en estado natural. En algunas realizaciones, puede estar en una solución seca o acuosa. La pureza y la homogeneidad pueden determinarse usando técnicas de química analítica como la electroforesis en gel de poliacrilamida o la cromatografía líquida de alta resolución. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado se separa de los marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican una proteína distinta del gen de interés. El término "purificado" denota que un ácido nucleico o proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético. En algunas realizaciones, esto puede denotar que el ácido nucleico o la proteína tiene por lo menos un 85% de pureza, más preferiblemente por lo menos un 95% de pureza, y más preferiblemente por lo menos un 99% de pureza de moléculas que están presentes en condiciones *in vivo*.

El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o a los ácidos ribonucleicos (ARN) y a sus polímeros en forma de cadena sencilla o doble. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes modificadas de manera conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones degeneradas de codones), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones degeneradas de codones pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye por residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzner, M. A. et al., "Enhanced evolutionary PCR using oligonucleotides with inosine at the 3'-terminus," Nucleic Acid Res., Vol. 19, No. 18, págs. 5081, 1991; Ohtsuka, E. et al., "An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions," J. Biol. Chem., Vol. 260, Nº 5, págs. 2605-2608, 1985; Rossolini, G. M. et al., "Use of deoxyinosine-containing primers vs degenerate primers for polymerase chain reaction based on ambiguous sequence information," Mol. Cell. Probes, Vol. 8, Nº 2, págs. 91-98, 1994).

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y a polímeros de aminoácidos de origen no natural.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican con posterioridad, por ejemplo, la hidroxiprolina, el gamma-carboxiglutamato y la O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, por ejemplo, un carbono alfa unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metilsulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales peptídicas modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos miméticos son compuestos químicos que tienen una estructura diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural.

El término "variantes modificadas de manera conservadora" se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, variantes modificadas de manera conservadora se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Así, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto de reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es normalmente el único codón para metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para triptófano) puede modificarse para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, en cada secuencia descrita está implícita cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, delecciones o

adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altere, añada o suprima un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante de manera conservadora modificada" en donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservadora se añaden a y no excluyen las variantes polimórficas, homólogas entre especies y alelos de la invención.

Cada uno de los ocho grupos siguientes contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:
 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, T. E., "Proteínas - Estructuras y propiedades moleculares", W. H. Freeman & Co. Ltd., 1984).

El término "porcentaje de identidad de secuencia" puede determinarse comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación, en donde la parte de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (por ejemplo, un polipéptido de la invención), que no comprende adiciones ni deleciones, para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece la misma base de ácido nucleico o residuo de aminoácido en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas secuencias. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia sobre una región especificada, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia de una secuencia de referencia), cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada como medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineamiento manual e inspección visual. Algunas realizaciones proporcionadas en la presente proporcionan polipéptidos o polinucleótidos que son sustancialmente idénticos a los polipéptidos o polinucleótidos, respectivamente, ejemplificados en la presente (por ejemplo, cualquiera o más de las regiones variables ejemplificadas en cualquiera de las Tablas 0.1, 0.2, 1, 2, o 3 y las FIGS. 5B-5E, 7C, 7D, 14B, 15B, 16B-16D, 20C-20G, 21B-21E, 22B, 28B-28E, 29B-29D, 32, 33, 35A-35C, 36A-36E, 40-69, 79, 80 y una o más de las secuencias de ácido nucleico ejemplificadas en una cualquiera de las FIGS. 7E, 34A-34F, 41-46, 48-53, 55-59, 61-64, 65A, 65B y 65C). Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que tiene por lo menos aproximadamente 15, 25 o 50 nucleótidos de longitud, o más preferiblemente sobre una región que tiene de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos de longitud, o sobre toda la longitud de la secuencia de referencia. Con respecto a las secuencias de aminoácidos, puede existir identidad o identidad sustancial en una región que tenga por lo menos 5, 10, 15 o 20 aminoácidos de longitud, opcionalmente por lo menos aproximadamente 25, 30, 35, 40, 50, 75 o 100 aminoácidos de longitud, opcionalmente por lo menos aproximadamente 150, 200 o 250 aminoácidos de longitud, o en toda la longitud de la secuencia de referencia. Con respecto a secuencias de aminoácidos más cortas, por ejemplo, secuencias de aminoácidos de 20 o menos aminoácidos, en algunas realizaciones, hay identidad sustancial cuando uno o dos residuos de aminoácidos se sustituyen de manera conservadora, de acuerdo con las sustituciones conservadoras definidas en la presente.

En algunas realizaciones, el porcentaje de identidad es sobre las regiones bisagra indicadas en la presente (la región bisagra y/o sus subpartes de regiones bisagra superior, central e inferior). En tales situaciones, el porcentaje de identidad de la región bisagra o su subparte puede identificarse por separado del resto de la secuencia de proteína o ácido nucleico. Así, dos regiones bisagra (o regiones superior, central y/o inferior) pueden tener un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia sobre una región especificada, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia de una secuencia de referencia), a la vez que se permite que el resto de la proteína sea un 100% idéntica a la proteína de comparación, o a la vez que se permite que el resto de la proteína tenga también una variación de un porcentaje especificado de identidad.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Pueden usarse los parámetros predeterminados del programa o designarse parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia de las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en la presente, incluye referencia a un segmento de cualquier número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste de 20 a 600, habitualmente de

aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se hayan alineado óptimamente. Los métodos de alineamiento de secuencias para su comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman, S. B. et al., "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins," J. Mol. Biol., Vol. 48, Nº 3, págs. 443-453, 1970, mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson, W. R. et al., "Improved tools for biological sequence comparison," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 85, Nº 8, págs. 2444-2448, 1988, mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement, 1995).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul, S. F. et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," Nucleic Acids Res., Vol. 25, Nº 17, págs. 3389-3402, 1997, y Altschul, S. F. et al., "Basic local alignment search tool," J. Mol. Biol., Vol. 215, Nº 3, págs. 403-410, 1990, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta puntuación (HSP), identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, o que coincidan o que satisfagan algún umbral de puntuación de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina umbral de puntuación de la palabra colindante (Altschul, S. F. et al., supra). Estos resultados iniciales de palabras colindantes actúan como semillas para iniciar la búsqueda de HSP más largas que las contengan. Las palabras coincidentes se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde pueda aumentar la puntuación acumulada del alineamiento. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las palabras coincidentes en cada dirección se detiene cuando: la puntuación acumulada del alineamiento cae en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y una esperanza (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, Henikoff, S. et al., "Amino acid substitution matrices from protein blocks," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 89, Nº 22, págs. 10915-10919, 1992) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin, S. et al., "Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 90, Nº 12, págs. 5873-5877, 1993). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la suma de probabilidades más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01, y más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo cruzado con los anticuerpos creados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Así, en algunas realizaciones, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos hibridan entre sí en condiciones estrictas, como se describe a continuación. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que para amplificar la secuencia pueden usarse los mismos cebadores.

Los términos "sujeto", "paciente" e "individuo" se refieren indistintamente a una entidad que está siendo examinada y/o tratada. Esto puede incluir, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un humano o un mamífero primate no humano. El mamífero también puede ser un mamífero de laboratorio, por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster. En algunas realizaciones, el mamífero puede ser un mamífero agrícola (por ejemplo, equino, ovino, bovino, porcino, camélido) o doméstico (por ejemplo, canino, felino).

El término "coadministrar" se refiere a la administración de dos agentes activos en la sangre de un individuo

o en una muestra a analizar. Los agentes activos que se coadministran pueden administrarse de manera concurrente o secuencial.

Constructos de unión a antígeno

En la presente se aprecia que las secuencias dentro de la región bisagra pueden ser de especial relevancia para varios constructos de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el valor de la región bisagra puede ser especialmente alto, como en una disposición minicuerpo. Las secuencias dentro de la bisagra pueden incluir enlaces disulfuro que son útiles para la función de bisagra pero pueden tener resultados variables cuando se alteran. Como se divulga en la presente, y se muestra en los ejemplos siguientes, en algunas realizaciones, las secuencias de la región bisagra pueden configurarse para evitar y/o reducir el reordenamiento indeseable de disulfuro con residuos de cisteína presentes en otras regiones de la proteína y/o contener un número suficiente de pares de cisteína para mantener la integridad del dímero *in vivo*, evitar la formación de concatémeros y/o permitir la conjugación específica del sitio a una de las cisteínas emparejadas.

En algunas realizaciones, la estabilidad de un dímero de minicuerpo *in vivo* puede atribuirse a la asociación natural de Van-der-Waals entre los dominios C_H3, la formación de enlaces disulfuro dentro de las regiones bisagra y/o las interacciones entre V_H y V_L. Hasta la fecha, la mayoría de los minicuerpos se han manipulado usando las regiones bisagra superior y central de la IgG1 humana con una secuencia de extensión unida al dominio C_H3 de la IgG1 humana. Además de las variables mencionadas anteriormente, en la presente se proporcionan y caracterizan ambas orientaciones de un minicuerpo (por ejemplo, variantes scFv V_L-V_L (M1) y V_H-V_L (M2)), ya que la orientación de los constructos también puede alterar sus características (como se muestra en los ejemplos siguientes).

Algunas bisagras anteriores (por ejemplo, hulgG1 bisagra-extensión o γ1 EH1) han incluido una hulgG1 nativa en la bisagra superior (FIG. 2). Esta cisteína en la posición 245 en el contexto de la IgG1 humana definida por Kabat e indicada por el primer círculo, crea problemas tanto con la heterogeneidad de la proteína como con la estabilidad en el formato de minicuerpo basándose en el mapeo de disulfuro por LC/MS, el análisis SDS-PAGE y los datos de biodistribución *in vivo*. Como se muestra en los ejemplos siguientes, en algunas realizaciones, Cys245 puede mutarse a serina, dando como resultado una bisagra artificial o "bisagra EH2" como se describe en la presente. Así, la eliminación de esta cisteína de una cadena (como se muestra en los ejemplos siguientes), ha dado como resultado una región bisagra mejorada. En algunas realizaciones, el constructo resultante (que carece de la primera cisteína en la región bisagra) no es lo suficientemente fuerte como para mantener la estabilidad del dímero del minicuerpo *in vivo* con los dos puentes disulfuro restantes (con respecto a γ1 EH/EH2). Por tanto, como se muestra en los ejemplos siguientes, puede introducirse una tercera o un mayor número de cisteínas por cadena (por ejemplo, dentro de la región central) para crear un constructo mejorado. En algunas realizaciones, proporcionar una 3^a (o más) cisteína en la bisagra (una cisteína adicional sobre la bisagra nativa de IgG1, por cadena) aumenta la unión disulfuro e incrementa la estabilidad de la proteína. En algunas realizaciones, la estabilidad añadida proporcionada por el aumento de los enlaces disulfuro en la región bisagra permite la conjugación específica del sitio a una o más de una de las cisteínas con mantenimiento del dímero intacto. En algunas realizaciones, los minicuerpos hulgG2 de IAB2M, 20M, 1M e IAB22M incluyen la secuencia de bisagra/extensión de IgG2 humana (hulgG2) unida al dominio C_H3 de hulgG2. Por tanto, en algunas realizaciones, el dominio C_H3 puede ser un dominio C_H3 de hulgG2. En algunas realizaciones, puede emplearse cualquier opción para crear un enlace covalente entre las dos cadenas del péptido en lugar de cisteínas para formar un enlace disulfuro.

En la presente solicitud, cuando se hace referencia a la introducción de una cisteína (a menos que se indique lo contrario), denota la introducción de una cisteína por cadena de la bisagra (que comprende dos cadenas). Por tanto, 3, 4, 5, o 6 cisteínas dentro de una cadena significarán 6, 8, 10, o 12 cisteínas dentro de una bisagra, y 3, 4, 5, o 6 posibles enlaces disulfuro presentes (por supuesto, a menos que se indique, el número de enlaces disulfuro puede ser diferente, ya que algunos podrían usarse para marcadores y otros usos).

En algunas realizaciones, la bisagra/extensión de IgG2 - γ2 EH1 - dio como resultado un aumento de la agregación, donde la primera cisteína reactiva de la bisagra fue responsable de la formación de concatémeros en el formato IAB2M-γ2 EH1. En tales realizaciones, puede emplearse la bisagra superior nativa de hulgG2.

A continuación, se consideraron los aspectos anteriores para desarrollar una segunda configuración de algunas de las realizaciones de un constructo de bisagra. En esta segunda configuración, la primera cisteína de bisagra (la que se empareja con la cadena ligera kappa en un anticuerpo nativo) se mutó a serina dando como resultado IgG2 EH2 (γ2 EH2). Esta constructo se expresaba bien y tenía una buena estabilidad *in vivo*, tenía los 3 enlaces disulfuro formados correctamente como muestra el análisis de masas intactas, y tenía estabilidad demostrada con los constructos IAB2M y IAB22M (como se muestra en los ejemplos siguientes). Por tanto, en algunas realizaciones se proporciona en la presente una bisagra artificial o modificada de IgG2, en la que se ha alterado la primera cisteína y que proporciona un constructo de minicuerpo mejorado.

Como se demuestra en los ejemplos siguientes, los resultados mostraron que era ventajoso mutar la primera cisteína de bisagra de las bisagras IgG1 e IgG2 para evitar el emparejamiento erróneo de cisteínas. Como se

demuestra en los ejemplos siguientes, los resultados mostraron que era ventajoso tener más de 2 residuos de cisteína en la región central de bisagra por cadena para mantener la integridad estructural de la proteína. Como se demuestra en los ejemplos siguientes, los resultados mostraron que la bisagra IgG2 proporciona una solución para aumentar la estabilidad *in vivo*. Por tanto, en la presente se proporcionan constructos de unión a antígeno de mayor estabilidad *in vivo*, como los minicuerpos.

En algunas realizaciones, puede emplearse una bisagra IgG2. En algunas realizaciones, puede emplearse una bisagra IgG2 en donde la primera cisteína de la bisagra está mutada. En algunas realizaciones, la mutación de la lisina terminal (K) en los constructos de Mb no afectó a la expresión de la proteína pero generó proteína con carga más uniforme.

Como se analiza en los ejemplos, se evaluaron variantes de Mb adicionales basadas en la bisagra superior de IgG3 y secuencias de bisagra central de IgG1 modificadas en las que había por lo menos 3 residuos de cisteína en la región bisagra central por cadena. Como se indica en los ejemplos siguientes, se evaluaron los constructos IAB2M, IAB22M e IAB20M para demostrar la universalidad de los resultados en varios constructos con diferentes orientaciones y diferentes dianas. Los resultados indican que las ventajas descritas en la presente con respecto a las bisagras divulgadas actualmente estarían disponibles y serían aplicables a todos y cada uno de los constructos de unión a antígeno y minicuerpos en particular.

En algunas realizaciones, las bisagras pueden ser bisagras peptídicas y/o secuencias de ácido nucleico que codifican para las bisagras peptídicas. Todos los análisis relativos a la forma peptídica de las bisagras proporcionadas en la presente también designan estructuras y funciones correspondientes para secuencias de ácido nucleico que codifican los péptidos. En algunas realizaciones, las bisagras pueden incorporarse en un constructo de unión a antígeno, como un anticuerpo, como un minicuerpo. En cualquiera de los constructos de unión a antígeno proporcionados en la presente puede incorporarse cualquier bisagra o subparte de una bisagra (como una región bisagra superior, de bisagra central y/o de bisagra inferior), incluyendo, pero no limitadas a las de: Tablas 0.1, 0.2, 1, 2, o 3 y las FIGS. 5B-5E, 7C, 7D, 14B, 15B, 16B-16D, 20C-20G, 21B-21E, 22B, 28B-28E, 29B-29D, 32, 33, 35A-35C, 36A-36E, 40-69, 79, 80 y cualquiera de las secuencias de ácido nucleico ejemplificadas en cualquiera de las FIGS. 7E, 34A-34F, 41-46, 48-53, 55-59, 61-64, 65A, 65B, y 65C. En algunas realizaciones, la bisagra puede incluir una o más de las secuencias o subpartes mostradas en la Tabla 0.1. En algunas realizaciones, cualquiera de las bisagras inferiores puede entonces conectarse directa o indirectamente a un dominio C_H3.

TABLA 0.1

Variantes de bisagra (FIG. 38)			
Bisagra completa	Bisagra superior	Bisagra central	Bisagra inferior
IgG1 humana NH1 (SEQ ID NO: 21)	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 45)	CPPCP (SEQ ID NO: 51)	APELLGGP (SEQ ID NO: 58)
IgG1 humana EH1 (SEQ ID NO: 22)	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 45)	CPPC (SEQ ID NO: 50)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
IgG1 humana NH2 (SEQ ID NO: 23)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCP (SEQ ID NO: 51)	APELLGGP (SEQ ID NO: 58)
IgG1 humana EH2 (SEQ ID NO: 24)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPC (SEQ ID NO: 50)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
IgG1 humana NH3 (SEQ ID NO: 25)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCPPC (SEQ ID NO: 52)	APELLGGP (SEQ ID NO: 58)
IgG1 humana EH3 (SEQ ID NO: 26)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCPPC (SEQ ID NO: 52)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
IgG1 humana NH4 (SEQ ID NO: 27)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCVCPPC (SEQ ID NO: 53)	APELLGGP (SEQ ID NO: 58)
IgG1 humana EH4 (SEQ ID NO: 28)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCVCPPC (SEQ ID NO: 53)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
IgG1 humana NH5 (SEQ ID NO: 29)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCPPCPPC (SEQ ID NO: 54)	APELLGGP (SEQ ID NO: 58)
IgG1 humana EH5 (SEQ ID NO: 30)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCPPCPPC (SEQ ID NO: 54)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
IgG2 humana NH1 (SEQ ID NO: 31)	ERK (SEQ ID NO: 47)	CCVECPCP (SEQ ID NO: 55)	APPVAGP (SEQ ID NO: 60)

(continuación)

Variantes de bisagra (FIG. 38)			
Bisagra completa	Bisagra superior	Bisagra central	Bisagra inferior
IgG2 humana EH1 (SEQ ID NO: 32)	ERK (SEQ ID NO: 47)	CCVECPPCP (SEQ ID NO: 55)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
IgG2 humana NH2 (SEQ ID NO: 33)	ERK (SEQ ID NO: 47)	SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)	APPVAGP (SEQ ID NO: 60)
IgG2 humana EH2 (SEQ ID NO: 34)	ERK (SEQ ID NO: 47)	SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
IgG3/IgG1 EH6 (SEQ ID NO: 35)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)	CVECPPC (SEQ ID NO: 57)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
IgG3/IgG1 EH7 (SEQ ID NO: 36)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)	CPPCPPC (SEQ ID NO: 52)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
IgG3/IgG1 EH8 (SEQ ID NO: 37)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)	CPPCPPCPPC (SEQ ID NO: 54)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
IgG4 NH (SEQ ID NO: 38)	ESKYGPP (SEQ ID NO: 49)	CPPCP (SEQ ID NO: 51)	APEFLGGP (SEQ ID NO: 61)
IgG4 EH (SEQ ID NO: 39)	ESKYGPP (SEQ ID NO: 49)	CPPCP (SEQ ID NO: 51)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)

En algunas realizaciones, la bisagra comprende, consiste o consiste esencialmente en cualquiera de las secuencias de la Tabla 0.1 anterior. En algunas realizaciones, la bisagra consiste en cada una de las regiones bisagra superior, central e inferior designadas en la Tabla 0.1. En algunas realizaciones, cualquiera de las subpartes anteriores (como la bisagra superior, central y/o inferior) también puede proporcionarse como una variante de las mismas. En algunas realizaciones, las variantes tienen identidad sustancial con las secuencias anteriores. En algunas realizaciones, las variantes tienen uno, dos o tres aminoácidos de diferencia con respecto a las secuencias señaladas anteriormente. En algunas realizaciones, las variantes tienen uno, dos o tres aminoácidos de diferencia con respecto a las secuencias indicadas anteriormente y las diferencias son diferencias conservadoras.

En algunas realizaciones puede alterarse el motivo CPPC (SEQ ID NO: 50) en la región central a cualquier otro motivo efectivo central, siempre y cuando el número y/o efectividad de los enlaces covalentes presentados en la tabla anterior sean reemplazados adecuadamente.

En algunas realizaciones, se proporciona una región bisagra peptídica para un anticuerpo. La región bisagra puede incluir una región bisagra superior que no comprende aminoácidos capaces de reticularse con un aminoácido correspondiente. La región bisagra de aminoácidos puede incluir además una región bisagra central conectada C-terminal a la región bisagra superior. En algunas realizaciones, la región bisagra central comprende por lo menos tres cisteínas a cada lado de la bisagra (por tanto, por lo menos seis cisteínas para la estructura ensamblada). En algunas realizaciones, la región bisagra de aminoácidos comprende además una región bisagra o extensión inferior conectada C-terminal a la región bisagra central. En algunas realizaciones, la región bisagra inferior o de extensión puede incluir por lo menos una de: APPVAGP (SEQ ID NO: 60), APELLGGP (SEQ ID NO: 58), o GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59).

En algunas realizaciones, la región bisagra superior no comprende cisteínas que reticulen dentro de la región bisagra superior. En algunas realizaciones, la región bisagra superior no comprende cisteínas. En algunas realizaciones, la región bisagra de aminoácidos comprende además una región bisagra inferior. En algunas realizaciones, estos constructos son constructos de origen no natural.

En algunas realizaciones, se proporciona una región bisagra de minicuerpo variante. La región bisagra de minicuerpo variante comprende una primera posición de aminoácido alterada. La primera posición de aminoácido alterada es un aminoácido que en una bisagra de anticuerpo nativo sería una cisteína, y se ha alterado en la primera posición alterada de tal manera que no forme un enlace disulfuro. La región bisagra de minicuerpo variante incluye además por lo menos tres cisteínas C-terminales a la primera posición de aminoácido alterada por cadena. En algunas realizaciones, puede haber 4, 5, 6 o más cisteínas C-terminales a la primera posición de aminoácido alterada por cadena. En algunas realizaciones, estas cisteínas adicionales están totalmente contenidas dentro de la región central de la bisagra (por supuesto, la bisagra central puede modificarse y expandirse más allá de las secuencias de tipo salvaje de tal manera que puedan añadirse las cisteínas adicionales). En algunas realizaciones, la región bisagra consiste en la SEQ ID NO: 1 ($X_{n1}CX_{n2}X_{n3}CX_{n4}X_{n5}C$). En algunas realizaciones, la SEQ ID NO: 1 es una región bisagra

central, y la región bisagra central consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la región bisagra central consiste en la SEQ ID NO: 1. En la descripción indicada anterior, el número de cisteínas se refiere al número de cisteínas en una única región bisagra de la cadena peptídica. Se entenderá que el número de cisteínas en la forma dimérica de la bisagra (en la que las cadenas peptídicas están reticuladas entre sí) será el doble, ya que las cisteínas indicadas forman parte cada una de un enlace disulfuro que implica a dos cisteínas.

En algunas realizaciones, los constructos de Mb contienen scFv de unión a antígeno con longitudes de conector variables que pueden estar en orientación V_L-V_L o V_H-V_L . Cualquier divulgación proporcionada en la presente referente a una orientación también contempla la orientación inversa y ambas orientaciones. En algunas realizaciones, cualquier secuencia de bisagra descrita en la Tabla 0.1 puede añadirse C-terminal a scFv. En algunas realizaciones, cualquier dominio C_{H3} de anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 puede añadirse C-terminal a scFv y bisagras apropiadas. En algunas realizaciones, para asegurar la unión disulfuro apropiada, la primera cisteína de bisagra (cisteína que habitualmente se empareja con la cadena ligera en anticuerpos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 nativos) se muta a una serina o alanina u otro aminoácido apropiado para evitar el reordenamiento de disulfuros y/o la concatemerización. En algunas realizaciones, para reducir la presencia o prevenir la formación de medias moléculas y asegurar una estabilidad óptima *in vivo*, la región bisagra puede contener por lo menos 3 enlaces disulfuro, en algunas realizaciones puede tener más. En algunas realizaciones, se incluyen por lo menos 3 enlaces disulfuro en la bisagra situados a distancias adecuadas entre sí para evitar la formación de enlaces disulfuro inadecuados y asegurar la formación adecuada de enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, se incluyen 3 enlaces disulfuro en la bisagra situados a distancias apropiadas entre sí para la estabilidad de la proteína *in vivo* y la depuración a través del hígado en lugar de la depuración renal. En algunas realizaciones, se proporcionan por lo menos 3 enlaces disulfuro (por ejemplo, 4 o más) en la bisagra para permitir el uso de una cisteína como asa, tras la reducción suave de los disulfuros, de fármacos, quelantes metálicos, radionucleidos, radioisótopos, conjugación específica de un quelante y posterior unión de un radioisótopo al quelante, o colorantes fluorescentes que usan cisteína como sitio de unión. Como puede apreciar un experto en la técnica, la presencia de un único enlace disulfuro indica la presencia de dos cisteínas, una en cada secuencia peptídica de la bisagra.

En algunas realizaciones, los Mb se construyen para que incluyan cualquiera de los componentes de bisagra proporcionados en la presente y conserven una afinidad similar (o la misma) para los anticuerpos originales. En algunas realizaciones, los Mb contruidos como se ha descrito anteriormente pueden manipularse para contengan dos dominios de unión a antígeno diferentes.

En algunas realizaciones, pueden obtenerse bisagras superiores para constructos de unión a antígeno eliminando una primera cisteína en la región bisagra, como se indica en la Tabla 0.1 anterior y en los ejemplos siguientes. Por tanto, en algunas realizaciones, puede proporcionarse una región bisagra en la que esta cisteína (que de otro modo estaría presente en la bisagra natural) se elimina o se altera a otro residuo (por ejemplo, un residuo que no puede formar un enlace covalente). En algunas realizaciones, este ajuste se hace en un contexto de IgG1 humana, o cualquier otra región bisagra que incluya la cisteína en la posición indicada en la Tabla 0.1 (por ejemplo, $\gamma 2$ EH1 alterada en $\gamma 2$ EH2 (Cys a Ser), y $\gamma 2$ NH1 alterada en $\gamma 2$ NH2 (Cys a Ser)).

En algunas realizaciones, se proporciona una región bisagra de aminoácidos que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 ($X_{n1}CX_{n2}X_{n3}CX_{n4}X_{n5}C$). X_{n1} puede ser cualquier aminoácido que no forme un enlace de reticulación covalente. En algunas realizaciones, $X_{(n2)}$ es uno cualquiera de: A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, o V. X_{n3} puede ser cualquier aminoácido. X_{n4} es cualquier aminoácido. X_{n5} es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_{n1} comprende una serina o una alanina (SEQ ID NO: 235). En algunas realizaciones, X_{n1} comprende una serina (SEQ ID NO: 210). En algunas realizaciones, X_{n1} comprende una alanina (SEQ ID NO: 211). En algunas realizaciones, X_{n1} comprende una T (SEQ ID NO: 236). En algunas realizaciones, la primera cisteína en la SEQ ID NO: 1 que se altera es una cisteína en un dominio $\gamma 2$. En algunas realizaciones, la región bisagra de aminoácidos comprende además aminoácidos adicionales delante de la SEQ ID NO: 1 ($X_{n1}CX_{n2}X_{n3}CX_{n4}X_{n5}C$).

En algunas realizaciones de $X_{n1}CX_{n2}X_{n3}CX_{n4}X_{n5}C$ (SEQ ID NO: 1), X_{n1} no forma un enlace de reticulación covalente con otro aminoácido (SEQ ID NO: 191). En algunas realizaciones, X_{n1} no es una cisteína (SEQ ID NO: 192). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, X_{n1} es uno de: A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, o V (SEQ ID NO: 193). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, X_{n2} es P, V o E (SEQ ID NO: 194). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, X_{n4} es P, V o E (SEQ ID NO: 196). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, X_{n4} es P o V (SEQ ID NO: 197). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, X_{n2} es P o V (SEQ ID NO: 195). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, X_{n3} es P o E (SEQ ID NO: 198). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, X_{n5} es P o E (SEQ ID NO: 199). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, X_{n3} es P o E y X_{n5} es P o E (SEQ ID NO: 237). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, $X_{n2}X_{n3}$ es VE (SEQ ID NO: 201). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, $X_{n2}X_{n3}$ es PP (SEQ ID NO: 202). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, $X_{n4}X_{n5}$ es VE (SEQ ID NO: 203). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, $X_{n4}X_{n5}$ es PP (SEQ ID NO: 204). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, $X_{n2}X_{n3}$ es VE y $X_{n4}X_{n5}$ es PP (SEQ ID NO: 205). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, $X_{n2}X_{n3}$ es VE o PP (SEQ ID NO: 238). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 1, $X_{n2}X_{n3}$ es VE (SEQ ID NO: 239).

En algunas realizaciones, cualquiera de las regiones bisagra mencionadas anteriormente comprende además una bisagra inferior o secuencia de extensión C-terminal a la última cisteína en $X_{n1}CX_{n2}X_{n3}CX_{n4}X_{n5}C$ (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, puede emplearse cualquier región bisagra inferior. En algunas realizaciones, cualquiera de las regiones bisagra mencionadas anteriormente comprende además una extensión o secuencia bisagra inferior C-terminal a la última cisteína en $X_{n1}CX_{n2}X_{n3}CX_{n4}X_{n5}C$ (SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones, la región bisagra de la SEQ ID NO: 1 y/o 2 es una región bisagra central. En algunas realizaciones, la bisagra comprende además una región bisagra superior adyacente a la región bisagra central. En algunas realizaciones, la bisagra comprende además una región bisagra inferior o de extensión adyacente a la región bisagra central. En algunas realizaciones, la región bisagra de aminoácidos comprende además una región bisagra superior adyacente a la región bisagra central.

En algunas realizaciones, la región bisagra de aminoácidos comprende la siguiente secuencia: SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56). En algunas realizaciones, la región bisagra de aminoácidos comprende la siguiente secuencia: ERKSCVECPPCP (SEQ ID NO: 167). En algunas realizaciones, la región bisagra de aminoácidos comprende la siguiente secuencia: EPKSSDKTHTCPPCPPC (SEQ ID NO: 168). En algunas realizaciones, la región bisagra de aminoácidos comprende por lo menos una de las siguientes secuencias: ERKSCVECPPCPGGSSGGSG (SEQ ID NO: 34) o ERKSCVECPPCPAPPVAGP (SEQ ID NO: 33). En algunas realizaciones, la región bisagra de aminoácidos comprende por lo menos la TCPPCPPC (SEQ ID NO: 166). En algunas realizaciones, la región bisagra de aminoácidos comprende por lo menos la EPKSSDKTHTCPPCPPCGGSSGGSG (SEQ ID NO: 26) o la EPKSSDKTHTCPPCPPCAPELLGGP (SEQ ID NO: 25).

En algunas realizaciones, pueden proporcionarse bisagras superiores eliminando la cisteína bisagra que es responsable de enlazar las cadenas pesada y ligera de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 respectivamente, como se muestra en la Tabla 0.1 y 3 (por ejemplo, de $\gamma 1$ EH1 a $\gamma 1$ EH2). Además, en algunas realizaciones, el uso de una región central con por lo menos tres cisteínas (por ejemplo, $\gamma 1$ EH3, $\gamma 1$ EH4 y $\gamma 1$ EH5) por cadena puede dar como resultado un constructo superior. En algunas realizaciones, puede proporcionarse una bisagra eliminando una cisteína de una región bisagra superior, como se muestra en las tablas 0.1 y 3 (por ejemplo, $\gamma 1$ EH1 a $\gamma 1$ EH2).

En algunas realizaciones, tales constructos pueden describirse como una región bisagra de aminoácidos que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 2 ($X_{n1}X_{n2}X_{n3}X_{n4}X_{n5}X_{n6}CX_{n7}X_{n8}CX_{n9}X_{n10}C$), en donde X_{n1} es cualquier aminoácido que no forma un enlace de reticulación covalente con otro aminoácido, en donde X_{n2} es cualquier aminoácido, en donde X_{n3} es cualquier aminoácido, en donde X_{n4} es cualquier aminoácido, en donde X_{n5} es cualquier aminoácido, en donde X_{n6} es cualquier aminoácido, en donde X_{n7} es cualquier aminoácido, en donde X_{n8} es cualquier aminoácido, en donde X_{n9} es cualquier aminoácido, y en donde X_{n10} es cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 240).

En algunas realizaciones, tales constructos pueden describirse como una región bisagra de aminoácidos que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 2 ($X_{n1}X_{n2}X_{n3}X_{n4}X_{n5}X_{n6}CX_{n7}X_{n8}CX_{n9}X_{n10}C$), en donde X_{n1} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n2} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n3} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n4} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n5} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n6} puede ser cualquier aminoácido distinto de una cisteína, en donde X_{n7} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n8} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n9} puede ser cualquier aminoácido, y en donde X_{n10} puede ser cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 241).

En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n1} no es una cisteína (SEQ ID NO: 213). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n1} es una serina o alanina (SEQ ID NO: 242). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n2} no es una cisteína (SEQ ID NO: 214). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n2} es una D (SEQ ID NO: 215). En algunas realizaciones, X_{n3} es una K (SEQ ID NO: 216). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n4} es una T (SEQ ID NO: 217). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n5} es un H (SEQ ID NO: 218). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n6} es una T (SEQ ID NO: 219). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n7} es una P o una V (SEQ ID NO: 220). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n8} es una P o una E (SEQ ID NO: 221). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n9} es una P o una V (SEQ ID NO: 222). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n10} es una P o una E (SEQ ID NO: 223). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n2} es una D, X_{n3} es una K, X_{n4} es una T, X_{n5} es una H, X_{n6} es una T, X_{n7} es una P o una V, X_{n8} es una P o una E, y X_{n9} es una P o una V (SEQ ID NO: 243).

En algunas realizaciones, la región bisagra de aminoácidos comprende además una secuencia $X_{n11}X_{n12}C$. En algunas realizaciones, esto puede estar inmediatamente unido a la cisteína C-terminal en la SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 244) o la SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 245). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n11} puede ser cualquier aminoácido, y X_{n12} puede ser cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 245). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n11} es una P o una V, y en donde X_{n12} es una P o una E (SEQ ID NO: 246). En algunas realizaciones de la SEQ ID NO: 2, X_{n1} es una serina, X_{n2} es una D, X_{n3} es una K, X_{n4} es una T, X_{n5} es una H, X_{n6} es una T, X_{n7} es una P, X_{n8} es una P, X_{n9} es una P, y X_{n10} es una P (SEQ ID NO: 247).

En algunas realizaciones, cualquiera de las secuencias bisagra puede estar precedida por cualquier número

de aminoácidos iniciales. Por tanto, a la molécula se le pueden añadir conectores o espaciadores adicionales de aminoácidos antes de la secuencia indicada (como SEQ ID NO: 1 y/o NO: 2). En algunas realizaciones, cualquiera de las secuencias bisagra puede ir seguida de cualquier número de aminoácidos adicionales. Por tanto, a la molécula se le pueden añadir conectores o espaciadores de aminoácidos adicionales después de la secuencia indicada (como SEQ ID NO: 1 y/o NO: 2).

En algunas realizaciones, la región bisagra comprende por lo menos una de las siguientes secuencias: CPPCPPC (SEQ ID NO: 52), CPPCVCPPC (SEQ ID NO: 53), o CPPCPPCPPC (SEQ ID NO: 54). En algunas realizaciones, la región bisagra comprende por lo menos una de las siguientes secuencias: ERKSCVCPPCPGGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 34), EPKSSDKTHTCPPCPPC (SEQ ID NO: 168), EPKSSDKTHTCPPCVCPPC (SEQ ID NO: 169), o EPKSSDKTHTCPPCPPCPPC (SEQ ID NO: 170). En algunas realizaciones, la región bisagra comprende por lo menos una de las siguientes secuencias: EPKSSDKTHTCPPCPPCGGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 26), EPKSSDKTHTCPPCVCPPCPGGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 28), o EPKSSDKTHTCPPCPPCPPCGGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 30).

En algunas realizaciones, la región/secuencia de bisagra inferior puede ser una secuencia de extensión (por ejemplo, 8-25 aminoácidos, como 8-20, 10-25, 10-22, 12-20, 14-16, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos). En la Tabla 0.1 y la Tabla 3 se muestran ejemplos de la bisagra inferior. En algunas realizaciones, la bisagra inferior puede ser una bisagra inferior nativa de γ 1, γ 2, γ 3 o γ 4. En algunas realizaciones, se puede tener una secuencia de bisagra nativa y añadir uno o más aminoácidos espaciadores (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más aminoácidos, como G o S).

En algunas realizaciones, una región bisagra de aminoácidos comprende una secuencia bisagra central de por lo menos una de: CVCPPCP (SEQ ID NO: 57), CPPCPPC (SEQ ID NO: 52), CPPCPPCPPC (SEQ ID NO: 54), o CPPCVCPPC (SEQ ID NO: 53) enlazada a una secuencia bisagra superior de ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48) o EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46).

En algunas realizaciones, cualquiera de las realizaciones descritas en la presente puede ser modificada o suplementada por una o más de las siguientes opciones.

En algunas realizaciones, la región bisagra comprende por lo menos tres cisteínas (en cada cadena, para un total de por lo menos 6 cisteínas entre las dos cadenas en el constructo de bisagra dimérica). En algunas realizaciones, la región bisagra comprende por lo menos cuatro cisteínas (en cada cadena). En algunas realizaciones, la región bisagra comprende por lo menos cinco cisteínas (en cada cadena). En algunas realizaciones, hay 6, 7, 8, 9, 10 o más cisteínas (en cada cadena). En algunas realizaciones, la región bisagra en su conjunto tiene el número de cisteínas indicado anteriormente (en cada cadena y/o en el constructo dimérico). En algunas realizaciones, están presentes en la región central de la bisagra todas las cisteínas indicadas. En algunas realizaciones, en la región bisagra central están presentes todas las cisteínas indicadas y no hay cisteínas adicionales en la región bisagra superior y/o en la región bisagra inferior. En algunas realizaciones, las cisteínas se distribuyen por toda la región bisagra de aminoácidos en un motivo "CXX" repetitivo (como CXXCXXCXX (SEQ ID NO: 171) o CXXCXX (SEQ ID NO: 172), o CXXCXXCXXCXX (SEQ ID NO: 173). En algunas realizaciones, las cisteínas se distribuyen a lo largo de la región bisagra central en un motivo CXX repetitivo. En algunas realizaciones, el motivo se repite 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces. En algunas realizaciones, cada X puede ser una P, V o E (SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173). En algunas realizaciones, X no es una cisteína (SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250).

En algunas realizaciones, la región bisagra central comprende por lo menos tres cisteínas por cadena que forman por lo menos tres enlaces disulfuro dentro de la región bisagra central. En algunas realizaciones, los constructos se expresan mucho mejor en células de mamífero y dan títulos más altos, así como una menor agregación y un producto más uniforme. En algunas realizaciones, cada una de las cisteínas presentes en la región bisagra central puede formar un enlace disulfuro con una cisteína correspondiente en su cadena emparejada en la bisagra. En algunas realizaciones, el enlace disulfuro se produce entre las cisteínas correspondientes de dos cadenas proteicas separadas, cada una siendo una región bisagra. En algunas realizaciones, se forman por lo menos 3 enlaces disulfuro, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más. En algunas realizaciones, pueden formarse por lo menos 3 enlaces disulfuro, por ejemplo, pueden formarse 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más enlaces disulfuro al mismo tiempo dentro de la estructura.

En algunas realizaciones, el primer residuo de la región bisagra central es una serina. En algunas realizaciones, la región bisagra central comprende SCVCPPCP (SEQ ID NO: 56).

En algunas realizaciones, el dominio C_H3 para cualquier constructo puede ser de γ 1, γ 2, o γ 3 y cualquier alelo de origen natural de los mismos. Como se usa en la presente " γ " es una abreviatura de gamma.

En algunas realizaciones, la extensión o región bisagra inferior comprende por lo menos una de S, G, A, P, o V. En algunas realizaciones, la secuencia de extensión comprende por lo menos GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59). En algunas realizaciones, la extensión o región bisagra inferior comprende por lo menos APPVAGP (SEQ ID NO: 60). En algunas realizaciones, la región bisagra inferior comprende por lo menos uno de: GGGSSGGGSG (SEQ ID NO:

59) o APPVAGP (SEQ ID NO: 60). En algunas realizaciones, la secuencia de bisagra inferior puede ser un conector GS, una secuencia de extensión y/o cualquier región bisagra inferior nativa de $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$.

Propiedades

En algunas realizaciones, las bisagras proporcionadas en la presente pueden permitir que se forme y/o esté presente un porcentaje menor de la media molécula en cualquier minicuerpo u otra composición de constructo de unión a antígeno. Por ejemplo, menos del 7% de la composición puede ser la media molécula, incluyendo intervalos como menos del 6, 5, 4, 3, 2, 1, y/o 0,5% de la composición siendo la media molécula.

En algunas realizaciones, cuando la bisagra está situada dentro de un minicuerpo, y cuando el minicuerpo se administra a un sujeto humano, la eliminación del minicuerpo del sujeto puede producirse a través del hígado y/o riñón. En algunas realizaciones, la depuración a través del hígado es de por lo menos el 10% o más, por ejemplo del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 o 100%. En algunas realizaciones, cuando está situada dentro de un minicuerpo, y cuando el minicuerpo se administra a un sujeto humano, la depuración del minicuerpo del sujeto puede producirse principalmente a través de los riñones. En algunas realizaciones, se elimina a través del riñón por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces o más del anticuerpo.

En algunas realizaciones, hay menos del 30% de agregación de un minicuerpo en una composición de minicuerpo. En algunas realizaciones, hay menos del 20% de agregación de un minicuerpo en una composición de minicuerpo. En algunas realizaciones, hay menos del 10% de agregación de un minicuerpo en una composición de minicuerpo. En algunas realizaciones, hay menos del 5% de agregación de un minicuerpo en una composición de minicuerpo. En algunas realizaciones, hay menos del 1% de agregación de un minicuerpo en una composición de minicuerpo.

Cuando el minicuerpo permanece como un dímero en circulación *in vivo*, entonces se predice que la depuración de la proteína se producirá principalmente a través del hígado. Por el contrario, cuando está presente la media molécula, entonces su depuración se producirá a través del riñón. Por tanto, en algunas realizaciones, los aspectos de la depuración anteriores son una forma de caracterizar la cantidad de media molécula resultante presente en un sujeto, *in vivo*, permitiendo determinar si la molécula completa administrada permanece como molécula completa *in vivo*, o si se descompone en la media molécula. En algunas realizaciones, la composición de minicuerpo es una en la que la depuración a través del hígado es relativamente alta en comparación con la depuración a través del riñón, y la captación tumoral del minicuerpo es relativamente alta. En algunas realizaciones, la proporción entre riñón e hígado es de menos de 1. En algunas realizaciones, se produce por lo menos un 1% más de captación a través del hígado que a través del riñón, por ejemplo, se produce por lo menos un 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de captación a través del hígado que a través del riñón. En algunas realizaciones, la captación del riñón al hígado es de 0,9:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000, etc. En algunas realizaciones, los varios constructos de bisagra proporcionados en la presente tienen una menor depuración a través de los riñones que la bisagra EH1 de IgG1.

En algunas realizaciones, la mutación de la primera cisteína bisagra a serina en la región bisagra de IgG1 ($\gamma 1$ EH2) para evitar la interacción no deseada con otra cisteína no emparejada generó una proteína con un mejor perfil *in vitro*. Sin embargo, la depuración elevada a través de los riñones, en comparación con el hígado, puede ser indicativa de inestabilidad de la proteína y disociación en medias moléculas *in vivo*. En algunas realizaciones, se proporcionan minicuerpos que tienen una bisagra de IgG2 en donde la primera cisteína de la bisagra está mutada a una serina ($\gamma 2$ EH2 y otras), tienen la propiedad de ser depurada a través del hígado según lo previsto para proteínas de aproximadamente 80 kDa. Esto indica que la molécula permanece intacta *in vivo*. En algunas realizaciones, la molécula permanece intacta durante 48 horas o más.

En algunas realizaciones, el constructo de bisagra proporcionado en la presente tiene menos del 9% de medias moléculas presentes debido a una primera cisteína de bisagra no emparejada. En algunas realizaciones, una bisagra IgG2 con una primera cisteína a serina tiene más del 99% de proteína dímero intacta presente, como aquella con $\gamma 2$ EH2. En algunas realizaciones, una variante de bisagra $\gamma 2$ da como resultado una menor captación renal. En algunas realizaciones, un Mb elaborado con una bisagra hulgG1 ($\gamma 1$ EH1) se depura rápidamente a través del riñón, dando como resultado un bajo direccionamiento tumoral. En algunas realizaciones, un Mb elaborado con variantes de bisagra hulgG2, ya sea bisagra extendida ($\gamma 2$ EH2) o bisagra natural ($\gamma 2$ NH1) muestra una mayor estabilidad *in vivo* con un alto direccionamiento tumoral y una menor depuración renal.

En algunas realizaciones, los minicuerpos $\gamma 1$ con bisagra EH2 se ensamblan adecuadamente en moléculas diméricas intactas, pero la inclusión de sólo 2 cisteínas produce proteínas con una elevada cantidad de media molécula. En algunas realizaciones, los minicuerpos $\gamma 1$ con bisagra EH3 se ensamblan adecuadamente en moléculas diméricas intactas y la adición de 3ª cisteínas por cadena produce una proteína con niveles muy bajos de media molécula. En algunas realizaciones, el nivel de media molécula es de menos del 15%, por ejemplo de menos del 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o menos del 1% de media molécula.

En algunas realizaciones, incluso aunque la región bisagra se haya variado y sea diferente de la descrita en

el pasado, las CDR, V_H/V_L s o secuencias de aminoácidos completas de los minicuerpos siguen uniéndose a la molécula diana con la misma afinidad que un anticuerpo (como un minicuerpo) con la bisagra de estilo anterior. Por tanto, en algunas realizaciones, la presencia de una bisagra como la proporcionada en la presente no altera ni afecta negativamente a la afinidad de unión del constructo de unión a antígeno, a la vez que sigue proporcionando una o más de las ventajas y/o estructuras proporcionadas en la presente.

En algunas realizaciones, se proporciona un minicuerpo que comprende una secuencia $X_{n1}CX_{n2}X_{n3}CX_{n4}X_{n5}C$ (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones, la SEQ ID NO: 3 está situada como la región bisagra central del minicuerpo. En algunas realizaciones, X_{n1} puede ser cualquier aminoácido o ningún aminoácido, X_{n2} puede ser cualquier aminoácido, X_{n3} puede ser cualquier aminoácido, X_{n4} puede ser cualquier aminoácido, y X_{n5} puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_{n1} no puede ser una cisteína, X_{n2} no puede ser una cisteína, X_{n3} no puede ser una cisteína, X_{n4} no puede ser una cisteína, y/o X_{n5} no puede ser una cisteína (SEQ ID NO: 251). En algunas realizaciones, X_{n1} es cualquier aminoácido distinto de una cisteína (SEQ ID NO: 229). En algunas realizaciones, X_{n1} es una serina (SEQ ID NO: 230).

En algunas realizaciones, se proporciona un minicuerpo que comprende una secuencia $X_{n1}CX_{n2}X_{n3}CX_{n4}X_{n5}CX_{n6}$ (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la SEQ ID NO: 4 está situada como la región bisagra central del minicuerpo. En algunas realizaciones, X_{n1} puede ser cualquier aminoácido o ningún aminoácido, X_{n2} puede ser cualquier aminoácido, X_{n3} puede ser cualquier aminoácido, X_{n4} puede ser cualquier aminoácido, y X_{n5} puede ser cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 252). En algunas realizaciones, X_{n1} no puede ser una cisteína, X_{n2} no puede ser una cisteína, X_{n3} no puede ser una cisteína, X_{n4} no puede ser una cisteína, y/o X_{n5} no puede ser una cisteína (SEQ ID NO: 253). En algunas realizaciones, X_{n1} es cualquier aminoácido distinto de una cisteína (SEQ ID NO: 254). En algunas realizaciones, X_{n1} es una serina (SEQ ID NO: 255). En algunas realizaciones, X_{n6} puede ser cualquier aminoácido, ningún aminoácido o P (SEQ ID NO: 256).

En algunas realizaciones, cualquiera de las regiones bisagra de aminoácidos o bisagras completas proporcionadas en la presente está dentro de un anticuerpo. En algunas realizaciones, cualquiera de las regiones bisagra de aminoácidos o bisagras completas proporcionadas en la presente está dentro de un fragmento de unión a anticuerpo. En algunas realizaciones, cualquiera de las regiones bisagra de aminoácidos o bisagras completas proporcionadas en la presente está dentro de un minicuerpo.

En algunas realizaciones, cualquiera de las regiones bisagra de aminoácidos o bisagras completas proporcionadas en la presente se encuentra dentro de un anticuerpo monoespecífico.

En algunas realizaciones, cualquiera de las regiones bisagra de aminoácidos o bisagras completas proporcionadas en la presente está dentro de un anticuerpo biespecífico. En algunas realizaciones, cualquiera de las regiones bisagra de aminoácidos o bisagras completas proporcionadas en la presente se ensambla en una proporción de 1:1. En algunas realizaciones, cualquiera de las regiones bisagra de aminoácidos o bisagras completas proporcionadas en la presente forma parte de un fragmento de anticuerpo que es un constructo biespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico es un minicuerpo.

Constructos específicos de unión a antígenos

En la presente se describen constructos de unión a antígeno que se unen a la diana. Un constructo de unión a antígeno es una molécula que incluye una o más porciones de una inmunoglobulina o molécula relacionada con inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactiva con la molécula diana. En algunas realizaciones, puede aplicarse cualquiera de las realizaciones de bisagra proporcionadas en la presente a cualquier constructo de unión a antígeno deseado. En algunas realizaciones, puede aplicarse cualquiera de las realizaciones de bisagra proporcionadas en la presente a un minicuerpo. En algunas realizaciones, puede aplicarse cualquiera de las realizaciones de bisagra proporcionadas en la presente a un minicuerpo que se une a CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA. En la FIG. 70 se muestra una realización no limitativa del antígeno PSMA. En la FIG. 71 se muestra una realización no limitativa del antígeno PSCA. En la FIG. 72 se muestra una realización no limitativa del antígeno 5T4. En las FIGS. 73 y 74 se muestran algunas realizaciones no limitativas del antígeno CD8. En las FIGS. 75-78 se muestran algunas realizaciones no limitativas del antígeno CD3. En algunas realizaciones, puede aplicarse cualquiera de las realizaciones de bisagra proporcionadas en la presente a un minicuerpo que se une específica y/o selectivamente a CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA. En algunas realizaciones, puede aplicarse cualquiera de las realizaciones de bisagra proporcionadas en las Tablas 0.1 o 3 a un minicuerpo que se une a CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA. En algunas realizaciones, puede aplicarse cualquiera de las realizaciones de bisagra completa a un minicuerpo que se une a CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA. En algunas realizaciones, puede aplicarse cualquiera de las realizaciones de bisagra superior a un minicuerpo que se une a CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA. En algunas realizaciones, puede aplicarse cualquiera de las realizaciones de bisagra central a un minicuerpo que se une a CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA. En algunas realizaciones, puede aplicarse cualquiera de las realizaciones de bisagra inferior a un minicuerpo que se une a CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA. En algunas realizaciones, puede aplicarse cualquiera de las realizaciones de bisagra superior y central a un minicuerpo que se une a CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA. En algunas realizaciones, puede aplicarse cualquiera de las realizaciones de bisagra central e inferior a un minicuerpo

que se une a CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA. En algunas realizaciones, puede aplicarse cualquiera de las realizaciones de bisagra superior e inferior a un minicuerpo que se une a CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA.

A continuación se proporcionan fragmentos de anticuerpos adicionales, como minicuerpos. Los fragmentos de anticuerpo pueden usarse, por ejemplo, para imagenología o con propósitos terapéuticos. Las representaciones esquemáticas de minicuerpos ejemplares se ilustran en las Figuras y/o se describen en la Tabla 0.2 a continuación (en la orientación M1 o en la orientación M2).

TABLA 0.2

Minicuerpos (de extremo N-terminal a extremo C-terminal) - Orientación estructural M1								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre	Péptido señal	Región 1	Conector	Región 2	Bisagra completa			Resto
					Bisagra superior	Bisagra central	Bisagra inferior	
IAB2M γ 1 EH1	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 13)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 22)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 45)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M γ 1 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 13)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 24)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M γ 2 EH1	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 13)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 32)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M γ 2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 13)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59):	
IAB2M γ 1 EH3	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 13)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 26)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ 2 EH1	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 15)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 32)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M 1 γ 2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 15)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ 1 EH1	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 15)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 22)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 45)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ 2 NH1	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 15)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 31)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 60)	
IAB22M γ 2 NH2	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 15)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 33)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 60)	
IAB22M γ 1 EH3	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 15)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 26)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 59)	

(continuación)

Minicuerpos (de extremo N-terminal a extremo C-terminal) - Orientación estructural M1								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre	Péptido señal	Región 1	Conector	Región 2	Bisagra completa			Resto
					Bisagra superior	Bisagra central	Bisagra inferior	
IAB22M γ1 EH5	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 15)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 30)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ3/γ1 EH6	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 15)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 35)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 57)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ3/γ1 EH7	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 15)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 36)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ3/γ1 EH8	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 15)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 37)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M y 1 EH5	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 13)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 30)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M γ3/γ1 EH6	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 13)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 35)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 57)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M y 3/γ1 EH7	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 13)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 36)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M- γ3/γ1 EH8	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 13)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 37)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ1 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 15)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 24)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB20M γ1 EH1	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 13)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 22)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 45)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB20M γ1 EH3	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 17)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 18)	(SEQ ID NO: 26)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB20M γ1 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 17)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 18)	(SEQ ID NO: 24)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	

(continuación)

Minicuerpos (de extremo N-terminal a extremo C-terminal) - Orientación estructural M1								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre	Péptido señal	Región 1	Conector	Región 2	Bisagra completa			Resto
					Bisagra superior	Bisagra central	Bisagra inferior	
IAB20M γ1 EH5	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 17)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 18)	(SEQ ID NO: 30)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB1M γ 1 EH1	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 67)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 68)	(SEQ ID NO: 22)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 45)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB1M 1 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 67)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 68)	(SEQ ID NO: 24)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB1M γ1 EH3	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 67)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 68)	(SEQ ID NO: 26)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB20M γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 17)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 18)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB20M γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 17)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 18)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 T26S, L28A, M57V de IgG2 (SEQ ID NO: 181)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB20M γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 17)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 18)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 T26W de IgG2 (SEQ ID NO: 182)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB25M γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 19)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB25M γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 19)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 T26S, L28A, M57V de IgG2 (SEQ ID NO: 181)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB25M γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _L (SEQ ID NO: 19)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _H (SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 T26W de IgG2 (SEQ ID NO: 182)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	

TABLA 0.2 CONTINUACIÓN

Minicuerpos (de extremo N- a C-terminal) - Orientación estructural M2								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre	Péptido señal	Región 1	Conector	Región 2	Bisagra completa			Resto
					Bisagra superior	Bisagra central	Bisagra inferior	
IAB2M γ1 EH1	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 14)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 22)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 45)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M γ1 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 14)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 24)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M γ2 EH1	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 14)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 32)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 14)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M γ1 EH3	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 14)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 26)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ2 EH1	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 16)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 32)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	ID NO: 55)	ID NO: 59)	
IAB22M1 γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 16)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ1 EH1	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 16)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 22)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 45)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ2 NH1	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 16)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 31)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 60)	
IAB22M γ2 NH2	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 16)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 33)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 60)	
IAB22M γ1 EH3	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 16)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 26)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ1 EH5	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 16)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 30)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	

(continuación)

Minicuerpos (de extremo N- a C-terminal) - Orientación estructural M2								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre	Péptido señal	Región 1	Conector	Región 2	Bisagra completa			Resto
					Bisagra superior	Bisagra central	Bisagra inferior	
IAB22M γ3/ γ1 EH6	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 16)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 35)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 57)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ3/ γ1 EH7	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 16)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 36)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ3/ γ1 EH8	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 16)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 37)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M γ1 EH5	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 14)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 30)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M γ3/γ 1 EH6	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 14)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 35)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M γ3/γ 1 EH7	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 14)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 36)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB2M γ3/γ 1 EH8	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 14)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 37)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 48)	ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB22M γ1 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 16)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 24)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	ID NO: 50)	ID NO: 59)	
IAB20M γ1 EH1	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 14)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 22)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 45)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB20M γ1 EH3	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 18)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 17)	(SEQ ID NO: 26)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB20M γ1 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 18)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 17)	(SEQ ID NO: 24)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB20M γ1 EH5	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 18)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 17)	(SEQ ID NO: 30)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 59)	

(continuación)

Minicuerpos (de extremo N- a C-terminal) - Orientación estructural M2								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre	Péptido señal	Región 1	Conector	Región 2	Bisagra completa			Resto
					Bisagra superior	Bisagra central	Bisagra inferior	
IAB1M γ1 EH1	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 68)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 22)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 45)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB1M γ1 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 68)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 24)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB1M γ1 EH3	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 68)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 26)			Dominio CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
					(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB20M γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 18)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 17)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB20M γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 18)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 17)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 T26S, L28A, M57V de IgG2 (SEQ ID NO: 181)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB20M γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 18)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 17)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 T26W de IgG2 (SEQ ID NO: 182)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB25M γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 20)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 42)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB25M γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 20)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 T26S, L28A, M57 de IgG2 V (SEQ ID NO: 181)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	
IAB25M γ2 EH2	(SEQ ID NO: 69)	V _H (SEQ ID NO: 20)	18aa (SEQ ID NO: 62)	V _L (SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 34)			Dominio CH3 T26W de IgG2 (SEQ ID NO: 182)
					(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 59)	

En la Tabla 0.2 se representan disposiciones de secuencias para monómeros que pueden usarse en minicuerpos (Tabla 0.2). Cada fila de la tabla representa la secuencia de un constructo monomérico, representando de izquierda a derecha de extremo N-terminal a extremo C-terminal. En algunas realizaciones, las secuencias mostradas de cada constructo monomérico están directamente unidas entre sí. Así, en algunas realizaciones, el constructo puede incluir cualquiera de los constructos de una sola fila de la Tabla 0.2. En algunas realizaciones, los constructos pueden incluir cualquier combinación de la Tabla 0.2. En algunas realizaciones, por ejemplo, el primer elemento de la primera fila, columna 3, puede combinarse con el de la primera fila, columna 4, con el de la primera fila, columna 5, con el de la primera fila, columnas 6-8, y con el de la primera fila, columna 9. En algunas realizaciones, la columna 3 y la columna 5 pueden intercambiarse entre sí. En algunas realizaciones, el primer elemento de la primera fila, columna 3, puede combinarse con el de la primera fila, columna 4, con la segunda fila, columna 5, con la segunda fila, columna 6-8, con la segunda fila, columna 9. Así, las tablas representan todas las combinaciones posibles, tanto dentro de una misma fila como entre varias filas (y con las columnas intercambiadas).

En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno contra CD8 incluye una cadena pesada CDR1 (HCDR1) de la HCDR 1 en la SEQ ID NO: 75; una cadena pesada CDR2 (HCDR2) de la HCDR2 en la SEQ ID NO: 76; una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) de la HCDR3 en la SEQ ID NO: 77; una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) de la LCDR1 en la SEQ ID NO: 78; una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) de la LCDR2 en la SEQ ID NO: 79; y/o una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) de la LCDR3 en la SEQ ID NO: 80. En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno contra PSMA incluye una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) de la HCDR 1 en la SEQ ID NO: 81; una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) de la HCDR2 en la SEQ ID NO: 82; una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) de la HCDR3 en la SEQ ID NO: 83; una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) de la LCDR1 en la SEQ ID NO: 84; una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) de la LCDR2 en la SEQ ID NO: 85; y/o una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) de la LCDR3 en la SEQ ID NO: 86. En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno contra 5T4 incluye una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) de la HCDR 1 en la SEQ ID NO: 87; una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) de la HCDR2 en la SEQ ID NO: 88; una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) de la HCDR3 en la SEQ ID NO: 89; una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) de la LCDR1 en la SEQ ID NO: 90; una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) de la LCDR2 en la SEQ ID NO: 91; y/o una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) de la LCDR3 en la SEQ ID NO: 92. En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno contra PSCA incluye una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) de la HCDR1 en la SEQ ID NO: 93; una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) de la HCDR2 en la SEQ ID NO: 94; una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) de la HCDR3 en la SEQ ID NO: 95; una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) de la LCDR1 en la SEQ ID NO: 96; una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) de la LCDR2 en la SEQ ID NO: 97; y/o una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) de la LCDR3 en la SEQ ID NO: 98. En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno contra CD3 incluye una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) de la HCDR1 en la FIG. 65B o 65C; una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) de la HCDR2 en la FIG. 65B o 65C; una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) de la HCDR3 en la FIG. 65B o 65C; una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) de la LCDR1 en la FIG. 65B o 65C; una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) de la LCDR2 en la FIG. 65B o 65C; y/o una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) de la LCDR3 en la FIG. 65B o 65C. En la Tabla 8 se muestran algunas realizaciones de secuencias de CDR que pueden usarse con una o más de las secuencias de bisagra proporcionadas en la presente.

TABLA 8

<i>Secuencias de CDR</i>					
	IAB22M (CD8)	IAB2M (PSMA)	IAB20M (5T4)	IAB1M (PSCA)	IAB25M (CD3)
HCDR 1	GFNIKDT (SEQ ID NO: 75)	GYTFTEY (SEQ ID NO: 81)	GYSFTGY (SEQ ID NO: 87)	GFNIKDY (SEQ ID NO: 93)	GYTFTRY (SEQ ID NO: 174)
HCDR 2	DPANDN (SEQ ID NO: 76)	NINPNNGG (SEQ ID NO: 82)	NPNNGV (SEQ ID NO: 88)	DPENGD (SEQ ID NO: 94)	NPSRGY (SEQ ID NO: 175)
HCDR 3	GYGYVFDH (SEQ ID NO: 77)	GWNFDY (SEQ ID NO: 83)	STMITNYVM DY (SEQ ID NO: 89)	GGF (SEQ ID NO: 95)	YYDDHYSLDY (SEQ ID NO: 176)
LCDR 1	RTSRISQYLA (SEQ ID NO: 78)	KASQDVGTAVD (SEQ ID NO: 84)	KASQSVSND VA (SEQ ID NO: 90)	SASSSVRFIH (SEQ ID NO: 96)	SASSSVSYMN (SEQ ID NO: 177)
LCDR 2	SGSTLQS (SEQ ID NO: 79)	WASTRHT (SEQ ID NO: 85)	YTSSRYA (SEQ ID NO: 91)	DTSKLAS (SEQ ID NO: 97)	DTSKLAS (SEQ ID NO: 97)
LCDR 3	QQHNENPLT (SEQ ID NO: 80)	QQYNSYPLT (SEQ ID NO: 86)	QQDYNSPPT (SEQ ID NO: 92)	QQWGSSPFT (SEQ ID NO: 98)	QQWSSNPFT (SEQ ID NO: 178)

Estos constructos pueden estar en cualquiera de las formas proporcionadas en la presente, incluyendo minicuerpos, scFv, etc. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno incluye 6, 5, 4, 3, 2, o 1, las CDR anteriores (algunas realizaciones de las CDR se indican en las FIG. 41, 48, 55, 61, 65B, o 65C). En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las CDR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra superiores proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las CDR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra central proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las CDR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra inferiores proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las CDR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra completa proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las CDR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra superior y central proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las CDR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra central e inferior proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las CDR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de estas realizaciones basadas en CDR puede formar parte de un minicuerpo. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno incluye CDR3 de cadena

pesada (HCDR3). En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se une específicamente a la molécula diana. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno compite por la unión con uno o más de los anticuerpos que tienen las CDR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno incluye por lo menos las 3 CDR de cadena pesada indicadas en la presente. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno incluye CDR3 de cadena pesada. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno incluye además cualquiera de las secuencias CDR2 de cadena pesada proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de estas realizaciones puede aplicarse a un minicuerpo que se une a CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno es humano o humanizado. Cuando se usa en el contexto de un minicuerpo, el término humano no denota que el constructo sea idéntico al que se encuentra en la naturaleza en los humanos, sino más bien que el constructo tiene secuencias que son humanas. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno incluye por lo menos una región marco humana (por ejemplo, aquellas secciones mostradas antes, entre y después de las CDR mostradas en las FIG. 41, 48, 55, 61, 65B o 65C, o una región marco con por lo menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97% o 99% de identidad con una región marco humana. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno incluye 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 de las FR enumeradas. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las FR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra superior proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las FR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra central proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las FR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra inferior proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las FR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra completas proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las FR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra superior y central proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las FR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra central e inferior proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de las FR proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de estas realizaciones basadas en FR puede formar parte de un minicuerpo. En algunas realizaciones, cualquiera de estas realizaciones puede aplicarse a un minicuerpo que se une a CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno tiene una región variable de cadena pesada de la región variable de cadena pesada en las SEQ ID NO: 14 (PSMA), 16 o 99 (CD8), 18 o 102 (5T4), 68 (PSCA), o, 20 o 104 (o FIGS. 65B y 65C) (CD3). En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno tiene una región variable de cadena pesada que incluye una secuencia con por lo menos aproximadamente un 80% de identidad, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con las SEQ ID NO: 14 (PSMA), 16 o 99 (CD8), 18 o 102 (5T4), 68 (PSCA), o, 20 o 104 (o FIGS. 65B y 65C) (CD3). En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno tiene una región variable de cadena ligera que incluye la SEQ ID NO: 13 (PSMA), 15 (CD8), 17 o 100 o 101 (5T4), 67 (PSCA), o, 19 o 103 (o FIGS. 65B y 65C) (CD3). En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno tiene una región variable de cadena ligera que incluye una secuencia con por lo menos aproximadamente un 80% de identidad, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 13 (PSMA), 15 (CD8), 17 o 100 o 101 (5T4), 67 (PSCA), o, 19 o 103 (o FIGS. 65B y 65C) (CD3). En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno es un constructo de unión a antígeno humano y tiene una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera, o una cadena pesada y ligera que es por lo menos tan idéntica como por lo menos las secuencias variables de cadena pesada y/o ligera indicadas anteriormente. En algunas realizaciones, cualquiera de las realizaciones anteriores se combina con cualquiera de las realizaciones de bisagra proporcionadas en la presente incluyendo, por ejemplo, en un contexto de minicuerpo. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de los emparejamientos de V_H y V_L proporcionados en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra superior proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de los emparejamientos de V_H y V_L proporcionados en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra central proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de los emparejamientos de V_H y V_L proporcionados en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra inferior proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de los emparejamientos de V_H y V_L proporcionados en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra completa proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de los emparejamientos V_H y V_L proporcionados en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra superior y central proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de los emparejamientos de V_H y V_L proporcionados en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de las secciones de bisagra central e inferior proporcionadas en la presente puede combinarse con cualquiera de los emparejamientos de V_H y V_L proporcionados en la presente. En algunas realizaciones, cualquiera de estos emparejamientos de V_H y V_L basados en realizaciones puede formar parte de un minicuerpo. En algunas realizaciones, cualquiera de estas realizaciones puede aplicarse a un minicuerpo que se une a CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno incluye un marcador detectable. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno incluye un agente terapéutico.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno es bivalente. El constructo de unión a antígeno bivalente puede incluir por lo menos un primer dominio de unión a antígeno, por ejemplo un primer scFv, y por lo menos un segundo dominio de unión a antígeno, por ejemplo un segundo scFv. En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno bivalente es un multímero que incluye por lo menos dos monómeros, por ejemplo por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 monómeros, cada uno de los cuales tiene un dominio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno es un minicuerpo. En algunas realizaciones, en el constructo bivalente se incluyen una o más subpartes de las bisagras proporcionadas en la presente. El minicuerpo puede incluir cualquiera de las secuencias de CDR y región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera proporcionadas en la presente (por ejemplo, las secuencias CDR proporcionadas en las FIG. 41, 48, 55, 61, 65B o 65C). En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno es un scFv monovalente. En algunas realizaciones, se proporciona un scFv monovalente que incluye la CDR1 de cadena pesada (HCDR1) en la HCDR1 de la FIG. 41, 48, 55, 61, 65B, o 65C, la CDR2 de cadena pesada (HCDR2) en la HCDR2 de la FIG. 41, 48, 55, 61, 65B, o 65C, la HCDR3 en la HCDR3 de la FIG. 41, 48, 55, 61, 65B, o 65C, la CDR1 de cadena ligera (LCDR1) en la LCDR1 de la FIG. 41, 48, 55, 61, 65B, o 65C, la CDR2 de cadena ligera (LCDR2) en la LCDR2 de la FIG. 41, 48, 55, 61, 65B, o 65C, y la CDR3 de cadena ligera (LCDR3) en la LCDR3 de la FIG. 41, 48, 55, 61, 65B, o 65C. En algunas realizaciones, el scFv monovalente incluye la región variable de cadena pesada de la región variable de cadena pesada en las FIG. 36A, 36B, 36C, 36D, 36E, 65B, o 65C. En algunas realizaciones, el scFv monovalente incluye la región variable de cadena ligera de la región variable de cadena ligera en las FIG. 36A, 36B, 36C, 36D, 36E, 65B o 65C. En algunas realizaciones, el scFv monovalente incluye la región variable de cadena pesada de la región variable de cadena pesada en las FIG. 66, 68 o 69, y la región variable de cadena ligera de la región variable de cadena ligera en las FIG. 67 o 69.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno es biespecífico. Los constructos biespecíficos pueden incluir por lo menos un primer dominio de unión, por ejemplo un scFv que se une específicamente a un primer epítipo, y por lo menos un segundo dominio de unión, por ejemplo un scFv que se une específicamente a un segundo epítipo. Por tanto, los constructos de unión a antígeno biespecíficos pueden unirse a dos o más epítipos. En algunas realizaciones, el primer epítipo y el segundo epítipo forman parte del mismo antígeno, por lo que el constructo de unión a antígeno biespecífico puede unirse por tanto a dos epítipos del mismo antígeno. En algunas realizaciones, el primer epítipo forma parte de un primer antígeno y el segundo epítipo forma parte de un segundo antígeno, por lo que el constructo biespecífico de unión a antígeno puede unirse a dos antígenos diferentes. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se une a dos epítipos simultáneamente.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno tiene una región variable de cadena pesada de la región variable de cadena pesada en la SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 68, 99, 102 o 104, y/o las secuencias en las FIGS. 65B y 65C. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno tiene una región variable de cadena pesada que incluye una secuencia con por lo menos aproximadamente un 80% de identidad, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 68, 99, 102 o 104 y/o las secuencias en las FIGS. 65B y 65C. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno tiene una región variable de cadena ligera que incluye la SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 67, 100, 101 o 103 y/o las secuencias en las FIGS. 65B y 65C. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno tiene una región variable de cadena ligera que incluye una secuencia con por lo menos aproximadamente un 80% de identidad, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 67, 100, 101 o 103 y/o las secuencias en las FIGS. 65B y 65C. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno es un constructo de unión a antígeno humano y tiene una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera, o una cadena pesada y ligera que es por lo menos tan idéntica como por lo menos las secuencias variables de cadena pesada y/o ligera indicadas anteriormente.

Algunas realizaciones proporcionadas en la presente incluyen un constructo de unión a antígeno que compite por la unión a la molécula diana con uno o más constructos de unión a antígeno proporcionados en la presente, e incluye una o más de las subpartes de bisagra proporcionadas en la presente (como en la Tabla 0.1). En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno competidor se une al mismo epítipo en la molécula diana que el constructo de unión a antígeno de referencia. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno de referencia se une a un primer epítipo de la molécula diana, y el constructo de unión a antígeno competidor se une a un segundo epítipo de la molécula diana, pero interfiere con la unión del constructo de unión a antígeno de referencia con la molécula diana, por ejemplo bloqueando estéricamente la unión del constructo de unión a antígeno de referencia, o induciendo un cambio conformacional en la molécula diana. En algunas realizaciones, el primer epítipo se solapa con el segundo epítipo.

En algunas realizaciones, los formatos scFv y/o minicuerpo tienen características farmacocinéticas ventajosas para la imagenología de diagnóstico y ciertas aplicaciones terapéuticas, a la vez que mantienen la alta afinidad de unión y especificidad de un anticuerpo original. En comparación con la imagenología con el anticuerpo

original de longitud completa, la farmacocinética es más deseable para estos fragmentos, ya que son capaces de dirigirse al antígeno y, a continuación, depurar rápidamente el sistema para la imagenología rápida de alto contraste. En algunas realizaciones, las vidas medias en circulación más cortas del minicuerpo permiten una imagenología óptima en un intervalo de tiempo de aproximadamente 6-48 72 horas (depende de la depuración y del nivel de "hundimiento" del antígeno y de la vida media del isótopo quelado a Mb) después de la inyección del minicuerpo. La rápida depuración de la sangre junto con una mejor penetración en los tejidos puede permitir la imagenología en el mismo día, lo que puede suponer una ventaja significativa en la clínica con respecto a la gestión de la atención al paciente.

En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpo pueden comprender una, dos o tres de las CDR de región variable ligera y/o una, dos o tres de las CDR de región variable pesada de un anticuerpo de PSCA, 5T4, PSMA, CD3 o CD8. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede contener una, dos o tres de las CDR de la región variable y/o una, dos o tres de las CDR de la región pesada variable de versiones murinas del anticuerpo de PSCA, 5T4, PSMA, CD3 o CD8. En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo comprende una o más regiones CDR de las regiones variable pesada o ligera de un anticuerpo de PSCA, 5T4, PSMA, CD3 o CD8 humanizado.

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno que se unen al antígeno PSCA pueden ser anticuerpos, minicuerpos y/o fragmentos de los mismos como scFv. En las FIGS. 29B - 29D, 36E, 60 (SEQ ID NO: 125 y 126), 61 (SEQ ID NO: 126), 62 (SEQ ID NO: 127), 63 (SEQ ID NO: 128), 64 (SEQ ID NO: 129), 65A (SEQ ID NO: 130) se muestran algunas realizaciones no limitativas de constructos de unión a antígeno contra PSCA. En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno que se unen al antígeno 5T4 pueden ser anticuerpos, minicuerpos y/o fragmentos de los mismos, como scFv. En las FIGS. 28B - 28E, 32, 36C, 54 (SEQ ID NO: 119 y 120), 55 (SEQ ID NO: 120), 56 (SEQ ID NO: 121), 57 (SEQ ID NO: 122), 58 (SEQ ID NO: 123), 59 (SEQ ID NO: 124), 67, 68 se muestran algunas realizaciones no limitativas de constructos de unión a antígeno contra 5T4. En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno que se unen al antígeno PSMA pueden ser anticuerpos, minicuerpos y/o fragmentos de los mismos como scFv. En las FIGS. 5B - 5E, 7C - 7E, 21B - 21E, 34A - 34F, 35A - 35C, 36A, 47 (SEQ ID NO: 112 y 113), 48 (SEQ ID NO: 113), 49 (SEQ ID NO: 114), 50 (SEQ ID NO: 115), 51 (SEQ ID NO: 116), 52 (SEQ ID NO: 117), 53 (SEQ ID NO: 118) se muestran algunas realizaciones no limitativas de constructos de unión a antígeno contra PSMA. En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno que se unen al antígeno CD3 pueden ser anticuerpos, minicuerpos y/o fragmentos de los mismos, como scFv. En las FIGS. 33, 36D, 69, 65B y 65C se muestran algunas realizaciones no limitativas de constructos de unión a antígeno contra CD3. En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno que se unen al antígeno CD8 pueden ser anticuerpos, minicuerpos y/o fragmentos de los mismos tales como scFv. En las FIGS. 14B, 15B, 16B - 16D, 20C - 20G, 22B, 36B, 40 (SEQ ID NO: 105 y 106), 41 (SEQ ID NO: 106), 42 (SEQ ID NO: 107), 43 (SEQ ID NO: 108), 44 (SEQ ID NO: 109), 45 (SEQ ID NO: 110), 46 (SEQ ID NO: 111), y 66 (SEQ ID NO: 111) se muestran algunas realizaciones no limitativas de constructos de unión a antígeno contra CD8.

Opciones del conector

En algunas realizaciones, para constructos individuales de unión a antígeno, los dominios variables de cadena pesada y ligera pueden asociarse de diferentes maneras. Por esta razón, el uso de diferentes longitudes de enlace entre los dominios V_H y V_L permite flexibilidad conformacional y rango de movimiento para asegurar la formación de los enlaces disulfuro.

En algunas realizaciones, las longitudes de los dos conectores pueden estar entre (e incluir) aproximadamente de 1 a 50 aminoácidos, por ejemplo, 2 a 15, 2 a 14, 3 a 13, 4 a 10, o de 5 aminoácidos a 8 aminoácidos. En algunas realizaciones, cada conector dentro de un par para un minicuerpo puede tener la misma longitud. En algunas realizaciones, cada conector dentro del par puede tener una longitud diferente. En algunas realizaciones, puede usarse cualquier combinación de pares de longitudes de conector, siempre que permitan y/o promuevan las combinaciones deseadas. En algunas realizaciones, puede usarse un aminoácido modificado.

La Tabla 0.2 proporciona variantes de minicuerpos. Producir y probar la expresión y unión de las variantes permite identificar un formato deseado para la producción de proteínas para cada nuevo minicuerpo.

En algunas realizaciones, el conector es un conector GlySer. El conector GlySer puede ser un polipéptido rico en residuos Gly y/o Ser. En algunas realizaciones, por lo menos aproximadamente el 40% de los residuos de aminoácidos del conector GlySer son Gly, Ser o una combinación de Gly y Ser, por ejemplo por lo menos aproximadamente el 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%. En algunas realizaciones, el conector GlySer tiene por lo menos aproximadamente 2 aminoácidos de longitud, por ejemplo por lo menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 o 40 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el motivo del conector puede ser $(G_3)S_n$ o $(G_4)S_n$ (n puede ser cualquier número de S; y en algunas realizaciones es 1 o 2). Por ejemplo, a) GGGGS 5 aa, (SEQ ID NO: 66); b) GGGGSGGGGS 10 aa, (SEQ ID NO: 65); c) GGGGSGGGGSGGGGS 15 aa, (SEQ ID NO: 64); d) GSTSGGGSGGGGS 12 aa, (SEQ ID NO: 63); o e) GSTSGGGSGGGSGGGGS 18 aa (SEQ ID NO: 62). En algunas realizaciones, el conector comprende por lo menos una treonina.

Las Tablas 0.1 y 0.2 representan varias secuencias opcionales que pueden usarse en algunas realizaciones de scFv y/o minicuerpos. En algunas realizaciones, el scFv puede ser cualquiera de los proporcionados en la presente, pero con cualquiera de las secuencias proporcionadas en la Tabla 0.1. En algunas realizaciones, el minicuerpo puede ser cualquiera de los proporcionados en la presente, pero con cualquiera de las secuencias proporcionadas en una fila completa en la Tabla 0.1. En algunas realizaciones, cualquiera de los constructos de unión a antígeno proporcionados en la presente puede incluir cualquiera de las subpartes de secuencia de bisagra proporcionadas en la Tabla 0.1.

Un "minicuerpo", como se describe en la presente, abarca un homodímero, en donde cada monómero es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) enlazado a un dominio C_H3 humano por una secuencia bisagra. En algunas realizaciones, la secuencia bisagra es una secuencia bisagra de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la secuencia bisagra es una cualquiera o más de las secuencias bisagra proporcionadas en la presente, como cualquiera de las descritas en la presente y/o en la Tabla 0.1 (incluyendo cualquier subparte o combinación de subpartes de la misma).

En algunas realizaciones, la secuencia de bisagra es una secuencia de bisagra artificial. En algunas realizaciones, la secuencia de bisagra puede ser una bisagra de IgG natural o artificial, o una subparte o combinación de subpartes de la misma, de una o más de las cuatro clases de bisagras de IgG.

En algunas realizaciones, la secuencia del minicuerpo puede incluir CDR y/o FR, y/o secuencias de región variable que sean similares a una secuencia descrita en la presente (por ejemplo, como se encuentra en las Figuras o en la Tabla 0.2.). En algunas realizaciones, el minicuerpo tiene una secuencia (CDR, varias CDR, conjunto completo de 6 CDR, región variable de cadena pesada, región variable de cadena ligera, regiones variables de cadena pesada y ligera, etc.) que es idéntica a un scFv de un minicuerpo descrito en la presente.

En algunas realizaciones, el polipéptido del monómero incluye secuencias como se muestra en la Tabla 0.2. En algunas realizaciones, el polipéptido del monómero incluye una secuencia con por lo menos aproximadamente un 80% de identidad, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la secuencia del monómero de minicuerpo V_LV_H mostrado en la Tabla 0.2.

En algunas realizaciones, el minicuerpo tiene una región de cadena variable (región variable de cadena pesada, ligera o pesada y ligera) que es por lo menos aproximadamente un 80% idéntica a una secuencia de cadena pesada en la SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 68, 99, 102 o 104 (y/o las secuencias relevantes en la FIG. 65B o 65C) y/o una secuencia de cadena ligera en la SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 67, 100, 101 o 103 (y/o las secuencias en la FIG. 65B o 65C), por ejemplo por lo menos aproximadamente un 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad.

El scFv puede tener una orientación V_HV_L o V_LV_H. En algunas realizaciones, la V_H y la V_L están enlazadas entre sí por una secuencia conectora de aminoácidos. El conector de aminoácidos puede ser un conector como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el conector es rico en Gly-Ser y tiene aproximadamente 15-20 aminoácidos de longitud. En otra realización, el conector es rico en GlySer y tiene 18 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, la longitud del conector varía entre (e incluye) aproximadamente de 1 a 50 aminoácidos, por ejemplo, de 2 a 30, de 3 a 20, de 4 a 15, o de 5 aminoácidos a 8 aminoácidos. En algunas realizaciones, el conector es GSTSGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO. 62). En algunas realizaciones, el scFv minicuerpo tiene una secuencia que es por lo menos aproximadamente un 80% idéntica a un scFv descrito en la presente, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad. El scFv puede tener una orientación V_HV_L o V_LV_H.

En algunas realizaciones, cada monómero del minicuerpo incluye los siguientes elementos, de extremo N-terminal a extremo C-terminal: (a) una secuencia scFv que incluye un dominio V_H enlazado a un dominio V_L y que se une a la molécula diana, (b) un dominio bisagra (por ejemplo, una región bisagra superior y central combinada con una región bisagra inferior y/o una región de extensión), y (c) una secuencia C_H3 de IgG humana. En algunas realizaciones, cada monómero del minicuerpo incluye un dominio C_H3 de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas realizaciones, el minicuerpo está codificado por un ácido nucleico que puede ser expresado por una célula, una línea celular u otro sistema de expresión adecuado como se describe en la presente. Por tanto, una secuencia señal puede fusionarse al extremo N-terminal del scFv para permitir la secreción del minicuerpo cuando se expresa en la célula o línea celular. En algunas realizaciones, pueden usarse otras secuencias señal como la albúmina sérica humana (SEQ ID NO: 70). En algunas realizaciones, diferentes secuencias señal pueden mejorar la secreción dependiendo del contexto y de la línea celular usada para la expresión. En algunas realizaciones, puede emplearse y/o incluirse una secuencia señal de cadena ligera de inmunoglobulina kappa humana (SEQ ID NO: 69) en un ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos proporcionada en la presente. En algunas realizaciones, puede seleccionarse una única secuencia de la lista mostrada en la Tabla 7 dependiendo del contexto y de la línea celular usada para la expresión.

TABLA 7

Secuencias de péptidos señal	
Fuente del péptido señal	Secuencia del péptido señal
cadena ligera kappa de Ig de ratón	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 69)
Albúmina sérica humana (HSA)	MKWVTFISLLFLFSSAYS (SEQ ID NO: 70)
Azurocidina humana (HAZ)	MTRLTVLALLAGLLASSRA (SEQ ID NO: 71)
Prolactina	MDSKGSSQKGSRLLLLWSNLLLCQGWS (SEQ ID NO: 72)
LCMV-GPC	MGQIVTMFEALPHIIDEVININVIIVLIITSIKAVYNFATCGILALVSFLAGRSCG (SEQ ID NO: 73)
MMTV-Rem	MPNHQSGSPTGSSDLLSGKKQRPHLALRRKRRREMRKINRKVRRMNLAPIKEKT AWQHLQALISEAEVLTQSQTQNSLTFLALLSVLGPPVVTG (SEQ ID NO: 74)
Mammalia	Accesible en Internet en signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia **.
Drosophila	Accesible en Internet en signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_drosophila **.
Bacterias	Accesible en Internet en signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_bacteria **.
Virus	Accesible en Internet en signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_viruses **.
**Los péptidos señal mencionados en los sitios de Internet mencionados anteriormente se describen en la Base de datos de péptidos señal, a la que puede accederse en Internet en signalpeptide.de y a través de los hipervínculos anteriores.	

En algunas realizaciones, se proporciona un minicuerpo quimérico que se une a la molécula diana. En algunas realizaciones, el minicuerpo quimérico incluye un monómero en el formato V_LV_H , e incluye la secuencia de una región variable de cadena ligera que incluye la SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 67, 100, 101 o 103 (y/o las secuencias relevantes en la FIG. 65B o 65C) y la secuencia de una región variable de cadena pesada que incluye la SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 68, 99, 102 o 104 (y/o las secuencias en la FIG. 65B o 65C) o un monómero como se muestra en la Tabla 0.2, o una secuencia que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad con la misma, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la misma. En algunas realizaciones, el minicuerpo quimérico incluye un monómero en el formato V_HV_L , e incluye la secuencia de una región variable de cadena ligera que incluye la SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 67, 100, 101 o 103 (y/o las secuencias relevantes en la FIG. 65B o 65C) y la secuencia de una región variable de cadena pesada que incluye la SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 68, 99, 102 o 104 (y/o las secuencias relevantes en la FIG. 65B o 65C) o un monómero como se muestra en la Tabla 0.2, o una secuencia que tiene por lo menos un 80% de identidad con la misma, por ejemplo por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la misma. En algunas realizaciones, el minicuerpo comprende una o más de los CDR representadas en la FIG. 41, 48, 55, 61, 65B o 65C. En algunas realizaciones, el minicuerpo comprende una o más de las regiones variables de la FIG. 36A, 36B, 36C, 36D, 36E, 66, 67, 68, 69, 65B, o 65C o de la Tabla 0.2.

En algunas realizaciones, el minicuerpo incluye la región variable de cadena pesada como se describe en la FIG. 36A, 36B, 36C, 36D, 36E, 66, 68, 69, 65B, o 65C. En algunas realizaciones, el minicuerpo incluye la región variable de cadena ligera como se representa en la FIG. 36A, 36B, 36C, 36D, 36E, 67, 69, 65B o 65C.

En algunas realizaciones, el minicuerpo incluye una o más de los CDR proporcionadas en las CDR en las FIG. 41, 48, 55, 61, 65B o 65C.

Ácidos nucleicos

En algunas realizaciones, los polipéptidos de los constructos de unión a antígeno pueden codificarse mediante ácidos nucleicos y expresarse *in vivo* o *in vitro*, o estos péptidos pueden sintetizarse químicamente. Por tanto, en algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica un constructo de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica una parte o monómero de un minicuerpo u otra constructo de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica dos o más monómeros, por ejemplo, por lo menos 2 monómeros. Los ácidos nucleicos que codifican múltiples monómeros pueden incluir sitios de escisión de ácido nucleico entre por lo menos dos monómeros, pueden codificar sitios de inicio de transcripción o traducción entre dos

o más monómeros, y/o pueden codificar sitios diana proteolíticos entre dos o más monómeros.

En algunas realizaciones, un vector de expresión contiene un ácido nucleico que codifica un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el vector de expresión incluye el vector pcDNA3.1™/myc-His (-) Versión A para expresión en mamíferos (Invitrogen, Inc.) o una variante del mismo. El vector de expresión pcDNA3.1 presenta un promotor CMV para la expresión en mamíferos y marcadores de selección tanto de mamíferos (Neomicina) como de bacterias (Ampicilina). En algunas realizaciones, el vector de expresión incluye un plásmido. En algunas realizaciones, el vector incluye un vector viral, por ejemplo un vector retroviral o adenoviral. En algunas realizaciones, el vector incluye un cósmido, un YAC o un BAC.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica por lo menos uno de los monómeros de minicuerpo comprende por lo menos una de las SEQ ID NO: proporcionadas en la presente, incluyendo las divulgadas en la presente para la unión a CD3, CD8, 5T4, PSMA y PSCA, o una secuencia que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad, por ejemplo aproximadamente un 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de identidad con la misma.

Líneas celulares

En algunas realizaciones, se proporciona una línea celular que expresa por lo menos uno de los constructos de unión a antígeno descritos en la presente (que puede incluir por lo menos una parte de una bisagra proporcionada en la presente). En algunas realizaciones, una línea celular de mamífero (por ejemplo, la línea celular CHO-K1) es un sistema de expresión para producir los minicuerpos, scFv u otros anticuerpos como se describe en la presente. En algunas realizaciones, los minicuerpos, scFv y otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos descritos en la presente no están glicosilados, y no se requiere un sistema de expresión de mamífero, ya que no se necesitan tales modificaciones postraduccionales. Por tanto, en algunas realizaciones, se usan uno o más de una amplia variedad de sistemas de expresión de mamíferos o no mamíferos para producir los constructos de unión a antígeno descritos en la presente (por ejemplo, minicuerpos) incluyendo, pero no limitados a, sistemas de expresión de mamíferos (por ejemplo, células CHO-K1), sistemas de expresión bacterianos (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) sistemas de expresión de levaduras (por ejemplo, *Pichia*, *S. cerevisiae*) o cualquier otro sistema de expresión conocido. Otros sistemas pueden incluir células de insectos y/o células vegetales.

Modificaciones de constructos de unión a antígeno

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno incluye por lo menos una modificación. Las modificaciones ejemplares incluyen, pero no se limitan a, constructos de unión a antígeno que han sido modificados por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica y unión a un ligando celular u otra proteína. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitadas a, escisión química específica, acetilación y síntesis metabólica de tunicamicina. En algunas realizaciones, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se conjuga con otra sustancia para formar un conjugado antidiaria. Los conjugados descritos en la presente pueden prepararse mediante métodos conocidos de enlace de constructos de unión a antígeno con lípidos, carbohidratos, proteínas u otros átomos y moléculas. En algunas realizaciones, el conjugado se forma por conjugación específica del sitio usando un enlace o unión adecuados. Es más probable que la conjugación específica del sitio preserve la actividad de unión de un constructo de unión a antígeno. La sustancia puede conjugarse o unirse en la región bisagra de un constructo de unión a antígeno reducida mediante la formación de un enlace tioéter. En algunas realizaciones, puede emplearse la conjugación con tirosina. Otros enlaces o uniones usados para formar el conjugado pueden incluir, pero no se limitan a, un enlace covalente, un enlace no covalente, un enlace disulfuro, un enlace hidrazona, un enlace éster, un enlace amido, y un enlace amino, un enlace imino, un enlace tiosemicarbazona, un enlace semicarbazona, un enlace oxima y un enlace carbono-carbono. En algunas realizaciones, no es necesario incluir cisteína u otro aspecto de enlace en el constructo de unión a antígeno.

Marcadores detectables

En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno modificado se conjuga con un marcador detectable. Como se usa en la presente, un "marcador detectable" incluye un átomo, molécula o compuesto que es útil para diagnosticar, detectar o visualizar una ubicación y/o cantidad de una molécula diana, célula, tejido, órgano y similares. Los marcadores detectables que pueden usarse de acuerdo con las presentes realizaciones incluyen, entre otros, sustancias radiactivas (por ejemplo, radioisótopos, radionucleidos, radiomarcadores o radiotrazadores), colorantes, agentes de contraste, compuestos o moléculas fluorescentes, compuestos o moléculas bioluminiscentes, enzimas y agentes potenciadores (por ejemplo, iones paramagnéticos). Además, algunas nanopartículas, por ejemplo, puntos cuánticos y nanopartículas metálicas (descritas más adelante) pueden ser adecuadas para su uso como agente de detección. En algunas realizaciones, el marcador detectable es verde de indocianina (ICG), circonio-89, IR800 y/u

otro colorante de infrarrojo cercano.

Las sustancias radiactivas ejemplares que pueden usarse como marcadores detectables de acuerdo con las realizaciones de la presente incluyen, pero no se limitan a, ^{18}F , ^{18}F -FAC, ^{32}P , ^{33}P , ^{45}Ti , ^{47}Sc , ^{52}Fe , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Sc , ^{77}As , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{99}Mo , ^{105}Pd , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , $^{154-158}\text{Gd}$, ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Lu , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{211}Pb , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra y ^{225}Ac . Los iones paramagnéticos ejemplares que pueden usarse como marcadores detectables incluyen, entre otros, iones de metales de transición y lantánidos (por ejemplo, metales con números atómicos de 6 a 9, 21-29, 42, 43, 44 o 57-71). Estos metales incluyen iones de Cr, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb y Lu.

Cuando el marcador detectable es un metal radiactivo o un ion paramagnético, en algunas realizaciones, el marcador puede hacerse reaccionar con un reactivo que tenga una cola larga con uno o más grupos quelantes unidos a la cola larga para unir estos iones. En algunas realizaciones, el reactivo puede llevar un grupo reactivo diseñado para atar covalentemente las cadenas de fragmentos de anticuerpos. La cola larga puede ser un polímero como una polilisina, polisacárido, polietilenglicol (PEG) u otra cadena derivatizada o derivatizable que tenga grupos colgantes a los que pueda unirse un grupo quelante para unir los iones. Ejemplos de grupos quelantes que pueden usarse de acuerdo con las realizaciones de la presente incluyen, pero no se limitan a, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), DOTA, NOTA, NODAGA, NETA, deferoxamina (Df, que también puede denominarse DFO), porfirinas, poliaminas, éteres de corona, bis-tiosemicarbazonas, polioximas y grupos similares. Los mismos quelatos, cuando forman complejos con metales no radiactivos, como el manganeso, el hierro y el gadolinio, son útiles para la MRI, cuando se usan junto con los constructos de unión a antígeno y los portadores descritos en la presente. Los quelatos macrocíclicos como NOTA, NODAGA, DOTA y TETA son de utilidad con una variedad de metales y radiometales incluyendo, pero no limitados a, radionucleidos de galio, itrio y cobre, respectivamente. Pueden usarse otros quelatos de tipo anillo, como los poliéteres macrocíclicos, que son de interés para la unión estable de radionucleidos, como el radio 223 para RAIT. En ciertas realizaciones, pueden usarse elementos quelantes para unir un agente de imagenología PET, como un complejo de Aluminio- ^{18}F o Circonio-89, a una molécula diana para su uso en análisis PET.

Agentes de contraste ejemplares que pueden usarse como marcadores detectables de acuerdo con las realizaciones de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, bario, diatrizoato, aceite etiodado, citrato de galio, ácido iocármico, ácido iocetámico, yodamida, yodipamida, ácido iodoxámico, iogulamida, iohexil, iopamidol, ácido iopanoico, ácido ioprocémico, ácido iosefámico, ácido iosérico, iosulamida meglumina, ácido iosemético, iotasul, ácido iotétrico, ácido iotalámico, ácido iotróxico, ácido ioxagílico, ácido ioxotrizoico, ipodato, meglumina, metrizamida, metrizoato, propiliodona, cloruro taloso, o combinaciones de los mismos.

Los compuestos o moléculas y colorantes bioluminiscentes y fluorescentes que pueden usarse como marcadores detectables de acuerdo con las realizaciones de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), OREGON GREEN™, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetra-rhodimina (TRITC), Cy3, Cy5, y similares, marcadores fluorescentes (por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP), ficoeritrina y similares), compuestos fluorescentes autoinactivados que son activados por proteasas asociadas a tumores, enzimas (por ejemplo, luciferasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y similares), nanopartículas, biotina, digoxigenina o una combinación de los mismos.

Las enzimas que pueden usarse como marcadores detectables de acuerdo con las realizaciones de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa o β -lactamasa. Tales enzimas pueden usarse en combinación con un cromógeno, un compuesto fluorogénico o un compuesto luminogénico para generar una señal detectable.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se conjuga con una nanopartícula. El término "nanopartícula" se refiere a una partícula microscópica cuyo tamaño se mide en nanómetros, por ejemplo, una partícula con por lo menos una dimensión de menos de aproximadamente 100 nm. Las nanopartículas pueden usarse como sustancias detectables porque son lo suficientemente pequeñas como para dispersar la luz visible en lugar de absorberla. Por ejemplo, las nanopartículas de oro poseen importantes propiedades de extinción de la luz visible y aparecen de color rojo intenso a negro en solución. Como resultado, las composiciones que comprenden constructos de unión a antígeno conjugadas con nanopartículas pueden usarse para la obtención de imágenes *in vivo* de células T en un sujeto. En el extremo más pequeño de la gama de tamaños, las nanopartículas suelen denominarse cúmulos. Se han formado nanopartículas metálicas, dieléctricas y semiconductoras, así como estructuras híbridas (por ejemplo, nanopartículas núcleo-corona). Las nanoesferas, nanobarras y nanocopas son sólo algunas de las formas que se han cultivado. Los puntos cuánticos semiconductores y los nanocristales son ejemplos de otros tipos de nanopartículas. Tales partículas a nanoescala, cuando se conjugan con un constructo de unión a antígeno, pueden usarse como agentes de imagenología para la detección *in vivo* de células T, tal como se describe en la presente.

En algunas realizaciones, tener una bisagra estable impartirá estabilidad al agente diana. En algunas realizaciones, esto da como resultado una mejor biodistribución, una mayor sensibilidad y/o un depuración renal

reducida. Por lo tanto, estos constructos pueden ser más aplicables para un mayor grado de actividad específica. En algunas realizaciones, esto imparte una sensibilidad sustancialmente mejorada sin dosis altas al riñón, que es un órgano radiosensible. En algunas realizaciones, estos constructos son más adecuados para RIT por la misma razón, baja captación renal. En algunas realizaciones, se puede emplear ahora una conjugación específica del sitio con cisteínas, ya que la reducción química en condiciones suaves romperá 1 o 2 enlaces disulfuro para usarlos como asa, pero mantendrá intactos los disulfuros restantes. En algunas realizaciones, esto preservará la integridad del conjugado de minicuerpo.

Agentes y composiciones terapéuticos

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica también puede incluir un portador farmacéuticamente aceptable. Un portador farmacéuticamente aceptable puede ser un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable que está implicado en el transporte de un compuesto de interés desde un tejido, órgano o parte del cuerpo a otro tejido, órgano o parte del cuerpo. Por ejemplo, el portador puede ser una carga, un diluyente, un excipiente, un solvente o un material de encapsulación líquidos o sólidos, o una combinación de los mismos. Cada componente del portador es "farmacéuticamente aceptable" en el sentido de que es compatible con los demás ingredientes de la formulación. También es adecuado para el contacto con cualquier tejido, órgano o parte del cuerpo que pueda encontrar, lo que significa que, idealmente, no conllevará un riesgo significativo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad o cualquier otra complicación que supere excesivamente sus beneficios terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden administrarse por cualquier vía de administración adecuada. Una vía de administración puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, incluyendo pero no limitadas a aerosol, enteral, nasal, oftálmica, oral, parenteral, rectal, transdérmica (por ejemplo, crema o pomada tópica, parche) o vaginal. La administración "transdérmica" puede realizarse usando una crema o pomada tópica o mediante un parche transdérmico. "Parenteral" se refiere a una vía de administración que generalmente se asocia con la inyección, incluyendo infraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosa o transtraqueal. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno puede administrarse intraoperatoriamente como administración local durante una intervención o resección.

En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno se conjuga con un agente terapéutico. Un "agente terapéutico" como se usa en la presente es un átomo, molécula o compuesto que es útil en el tratamiento de un trastorno relacionado con una molécula diana. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, entre otros, fármacos, agentes quimioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos y fragmentos de anticuerpos, toxinas, radioisótopos, enzimas (por ejemplo, enzimas para escindir profármacos a un agente citotóxico en el sitio de unión del constructo de unión a antígeno), nucleasas, hormonas, inmunomoduladores, oligonucleótidos antisentido, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos y colorantes, y nanopartículas. Los ejemplos de trastornos incluyen los relacionados con una o más moléculas diana. En algunas realizaciones, las moléculas diana pueden ser una o más de: CD8, CD3, PSMA, PSCA y 5T4.

Los agentes quimioterapéuticos tienen a menudo naturaleza citotóxica o citostática y pueden incluir agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores mitóticos, terapia hormonal, agentes terapéuticos dirigidos y agentes inmunoterapéuticos. En algunas realizaciones, los agentes quimioterapéuticos que pueden usarse como marcadores detectables de acuerdo con las realizaciones de la divulgación incluyen, entre otros, ácido 13-cisretinoico, 2-clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina-D, adriamicina, aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, ácido todo-transretinoico, interferón alfa, altretamina, ametopterina, amifostina, anagrelida, anastrozol, arabinosilcitosina, trióxido de arsénico, amsacrina, aminocamptotecina, aminoglutetimida, asparaginasa, azacitidina, bacilo Calmette-Guérin (BCG), bendamustina, bevacizumab, bexaroteno, bicalutamida, bortezomib, bleomicina, busulfán, leucovorina cálcica, factor citrovorum, capecitabina, canertinib, carboplatino, carmustina, cetuximab, clorambucil, cisplatino, cladribina, cortisona, ciclofosfamida, citarabina, darbepoetina alfa, dasatinib, daunomicina, decitabina, denileukina difitox, dexametasona, dexasona, dextrazoxano, dactinomicina, daunorrubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, doxifluridina, eniluracilo, epirubicina, epoetina alfa, erlotinib, everolimus, exemestano, estramustina, etopósido, filgrastim, flouximesterona, fulvestrant, flavopiridol, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, goserelina, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, hexametilmelamina, hidrocortisona, hidroxiurea, ibritumomab, interferón alfa, interleucina-2, interleucina-11, isotretinoína, ixabepilona, idarubicina, mesilato de imatinib, ifosfamida, irinotecán, lapatinib, lenalidomida, letrozol, leucovorina, leuprolida, Ara-C liposomal, lomustina, mecloretamina, megestrol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metilprednisolona, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nelarabina, nilutamida, octreotida, oprelvekin, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pemetrexed, panitumumab, PEG-interferón, pegaspargasa, pegfilgrastim, PEG-L-asparaginasa, pentostatina, plicamicina, prednisolona, prednisona, procabazina, raloxifeno, rituximab, romiplostim, raltrexed, sapacitabina, sargramostim, satraplatino, sorafenib, sunitinib, semustina, estreptozocina, tamoxifeno, tegafur, tegafur-uracilo, temsirolimus, temozolamida, teniposida, talidomida, tioguanina,

tiotepa, topotecán, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, tretinoína, trinitrexato, alrubicina, vincristina, vinblastina, vindestina, vinorelbina, vorinostat o ácido zoledrónico.

Las toxinas que pueden usarse de acuerdo con las realizaciones de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, Auristatina E, Auristatina F, Dolastatina 10, Dolastatina 15, combretastatina y sus análogos, maytansinoide, calicheamicina, alfa-amanitina, dímeros de pirrolobenzodiazepina, epotilonas, duocamicina y sus análogos, tubulisina D, basilistatinas, ricina, abrina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina estafilocócica A, proteína antiviral de Phytolacca americana, gelonina, toxina diférica, exotoxina de Pseudomonas y endotoxina de Pseudomonas.

En algunas realizaciones, las nanopartículas se usan en aplicaciones terapéuticas como portadores de fármacos que, cuando se conjugan con un constructo de unión a antígeno, administran agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos, toxinas o cualquier otro agente citotóxico o anticanceroso conocido en la técnica a células cancerosas que sobreexpresan la diana en la superficie celular.

Cualquiera de los constructos de unión a antígeno descritos en la presente puede conjugarse además con uno o más agentes terapéuticos adicionales, marcadores detectables, nanopartículas, portadores o una combinación de los mismos. Por ejemplo, un constructo de unión a antígeno puede radiomarcarse con yodo-131 y conjugarse con un portador lipídico, de tal manera que el conjugado de molécula antidiána-lípido forme una micela. La micela puede incorporar uno o más marcadores terapéuticos o detectables. Alternativamente, además del portador, el constructo de unión a antígeno puede radiomarcarse con Yodo-131 I (por ejemplo, en un residuo de tirosina) y conjugarse con un fármaco (por ejemplo, en el grupo amino épsilon de un residuo de lisina), y el portador puede incorporar un marcador terapéutico o detectable adicional.

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno se conjugan con un agente terapéutico. Aunque estos constructos de unión a antígeno pueden tener una semivida de circulación más corta en comparación con un anticuerpo de longitud completa, en algunas realizaciones, estos formatos pueden mostrar una penetración tumoral mejorada basada en su tamaño más pequeño y ser terapéuticamente eficaces cuando se arman adecuadamente con un fármaco citotóxico o radioisótopo. En algunas realizaciones, puede emplearse un enfoque de anticuerpo fármaco-conjugado. En algunas realizaciones, un enfoque terapéutico incluye la radioinmunoterapia mediante la unión de un radiomarcador apropiado, como yodo 131, un emisor beta, como itrio 90, lutecio 177, cobre 67, astatina 211, plomo 212/bismuto 212, actinio 225/bismuto 213 y torio, que puede provocar daño y muerte celular en un tejido diana. En algunas realizaciones, el tratamiento con estos fragmentos armados con un fármaco citotóxico o radionucleido produce menos toxicidad inespecífica, ya que se depuran del organismo más rápidamente.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno puede conectarse a un agente terapéutico para un trastorno asociado con la expresión de la molécula diana.

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno de molécula diana se usan como medicamento independiente (por ejemplo, constructo de unión a antígeno en ausencia de agente terapéutico) en el tratamiento de un trastorno asociado con la expresión de la molécula diana.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la región bisagra de aminoácidos de cualquiera de las realizaciones proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, hay menos del 30% de agregación (o constructo de alto peso molecular) de un minicuerpo en la composición, por ejemplo, menos del 20, 10, 5 o 1% de agregación.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la región bisagra de aminoácidos de cualquiera de los constructos proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, puede usarse una cantidad de 1 microgramos a 100 mg. En algunas realizaciones, dicha composición puede tener un nivel reducido de agregación en comparación con los constructos sin las disposiciones de bisagra indicadas.

En algunas realizaciones, el trastorno es uno asociado con 5T4, CD8, CD3, PSCA o PSMA. Sin embargo, las varias bisagras divulgadas en la presente pueden aplicarse a cualquier molécula diana o constructo de unión a antígeno que incluya una bisagra.

Kits

En algunas realizaciones, se proporcionan kits. En algunas realizaciones, el kit incluye un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el kit incluye un ácido nucleico que codifica un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el kit incluye una línea celular que produce un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el kit incluye un marcador detectable como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el kit incluye un agente terapéutico como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el kit incluye tampones. En algunas realizaciones, el kit incluye controles positivos, por ejemplo células específicas de la diana, o fragmentos de las mismas. En algunas realizaciones, el kit incluye controles negativos, por ejemplo, una superficie o solución

sustancialmente libre de la diana. En algunas realizaciones, el kit incluye un envase. En algunas realizaciones, el kit incluye instrucciones.

Métodos de detección de la presencia o ausencia de la molécula diana

Los constructos de unión a antígeno pueden usarse para detectar la presencia o ausencia de la molécula diana *in vivo* y/o *in vitro*. Por consiguiente, algunas realizaciones incluyen métodos para detectar la presencia o ausencia de la diana. El método puede incluir la aplicación de un constructo de unión a antígeno a una muestra. El método puede incluir la detección de la unión o ausencia de unión del constructo de unión a antígeno a la molécula diana. En algunas realizaciones, mediante las opciones proporcionadas en la presente puede detectarse cualquier molécula diana. En algunas realizaciones, la molécula diana a detectar es una o más de 5T4, CD8, CD3, PSCA o PSMA. En algunas realizaciones, la molécula diana se detecta usando una o más de las disposiciones de minicuerpos proporcionadas en las figuras y/o en las Tablas, como la Tabla 0.2 (o por lo menos empleando una disposición de bisagra como se describe en la Tabla 0.1).

En la presente se proporcionan métodos para detectar la presencia o ausencia de la molécula diana. Se apreciará que los procesos siguientes pueden realizarse en cualquier secuencia, y/o pueden repetirse y/o eliminarse opcionalmente, y que al método pueden añadirse opcionalmente pasos adicionales. En algunas realizaciones, puede aplicarse a una muestra un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente. En algunas realizaciones, puede realizarse un lavado opcional. Opcionalmente, puede aplicarse a la muestra un constructo secundario de unión a antígeno. Puede realizarse un lavado opcional. En algunas realizaciones, puede detectarse la unión o ausencia de unión del constructo de unión a antígeno a la molécula diana.

En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente se aplica a una muestra *in vivo*. El constructo de unión a antígeno puede administrarse a un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano, por ejemplo una rata, ratón, cobaya, hámster, conejo, perro, gato, vaca, caballo, cabra, oveja, burro, cerdo, mono o simio. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se infunde en el sujeto. En algunas realizaciones, la infusión es intravenosa. En algunas realizaciones, la infusión es intraperitoneal. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se aplica tópica o localmente (como en el caso de una aplicación intervencionista o intraoperatoria) al sujeto. En algunas realizaciones, se aplica al sujeto una cápsula que contiene el constructo de unión a antígeno, por ejemplo por vía oral o intraperitoneal. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se selecciona para reducir el riesgo de una respuesta inmunogénica por parte del sujeto. Por ejemplo, para un sujeto humano, el constructo de unión a antígeno puede humanizarse como se describe en la presente. En algunas realizaciones, después de la aplicación *in vivo* del constructo de unión a antígeno, la muestra, o una parte de la muestra, se retira del huésped. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se aplica *in vivo*, se incuba *in vivo* durante un periodo de tiempo como se describe en la presente, y se extrae una muestra para análisis *in vitro*, por ejemplo, detección *in vitro* del constructo de unión a antígeno unido a la molécula diana o ausencia del mismo como se describe en la presente.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se aplica a una muestra *in vitro*. En algunas realizaciones, la muestra está recién recogida de un sujeto, por ejemplo una biopsia. En algunas realizaciones, la muestra se incuba después de su recogida de un sujeto. En algunas realizaciones, la muestra se fija. En algunas realizaciones, la muestra incluye un órgano y/o tejido completo. En algunas realizaciones, la muestra incluye una o más células completas. En algunas realizaciones, la muestra es de extractos celulares, por ejemplo lisados. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno en solución se añade a una solución de la muestra. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno en solución se añade a una muestra que no contiene solución, por ejemplo una muestra liofilizada, reconstituyendo de este modo la muestra. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno liofilizado se añade a una muestra que contiene solución, reconstituyendo de este modo el constructo de unión a antígeno.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se incuba opcionalmente con la muestra. El constructo de unión a antígeno puede incubarse durante un periodo de no más de aproximadamente 14 días, por ejemplo no más de aproximadamente 14 días, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 día, o no más de aproximadamente 23 horas, por ejemplo no más de aproximadamente 23 horas, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,7575, 0,5, 0,25, o 0,1 hora, incluyendo intervalos entre dos cualesquiera de los valores enumerados. En algunas realizaciones, la incubación se realiza en un sujeto al que se le administró el constructo de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la incubación se realiza en una incubadora. En algunas realizaciones, la incubadora se mantiene a una temperatura fija, por ejemplo de aproximadamente 21°C, temperatura ambiente, 25°C, 29°C, 34°C, 37°C, o 40°C.

En algunas realizaciones, se elimina opcionalmente de la muestra el constructo de unión a antígeno que no está unido a la diana. En algunas realizaciones, se lava la muestra. El lavado de una muestra puede incluir la eliminación de la solución que contiene el constructo de unión a antígeno no unido, y la adición de una solución que no contiene el constructo de unión a antígeno, por ejemplo una solución tampón. En algunas realizaciones, se lava una muestra *in vitro*, por ejemplo aspirando, pipeteando, bombeando o drenando la solución que contiene el constructo

de unión a antígeno no unido, y añadiendo solución que no contiene el constructo de unión a antígeno. En algunas realizaciones, una muestra se lava *in vivo*, por ejemplo administrando al sujeto una solución que no contenga el constructo de unión a antígeno, o lavando un sitio de administración tópica del constructo de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el lavado se realiza por lo menos dos veces, por ejemplo por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 veces. En algunas realizaciones, después del lavado o lavados, se elimina de la muestra por lo menos aproximadamente el 50% del anticuerpo no unido, por ejemplo por lo menos aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más.

En algunas realizaciones, se elimina de la muestra el constructo de unión a antígeno no unido. Después de la aplicación del constructo de unión a antígeno a la muestra, el constructo de unión a antígeno unido a la diana alcanza un equilibrio con el constructo de unión a antígeno no unido a la diana, de tal manera que en algún momento después de la aplicación del constructo de unión a antígeno, la cantidad de constructo de unión a antígeno unido a la diana no aumenta sustancialmente. Transcurrido este tiempo, puede eliminarse por lo menos parte de la cantidad de constructo de unión a antígeno no unido a la diana. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno no unido se elimina mediante procesos metabólicos u otros procesos corporales del sujeto al que se le administró el anticuerpo o fragmento. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno no unido se elimina mediante la adición de un agente que destruye o desestabiliza el constructo de unión a antígeno no unido, por ejemplo una proteasa o un anticuerpo neutralizante. En algunas realizaciones, 1 día después de la aplicación del constructo de unión a antígeno, se ha eliminado por lo menos aproximadamente el 30% del constructo de unión a antígeno que se aplicó, por ejemplo por lo menos aproximadamente el 30%, 40%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 99,9%. En algunas realizaciones, 2 días después de la aplicación del constructo de unión a antígeno, se ha eliminado por lo menos aproximadamente el 40% del constructo de unión a antígeno que se aplicó, por ejemplo por lo menos aproximadamente el 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 99,9%.

En algunas realizaciones, se detecta la presencia o ausencia de la molécula diana. La presencia o ausencia de la diana puede detectarse basándose en la presencia o ausencia del constructo de unión a antígeno en la muestra. Después de la retirada y/o eliminación del constructo de unión a antígeno de la muestra, por ejemplo mediante lavado y/o eliminación metabólica, el constructo de unión a antígeno restante en la muestra puede indicar la presencia de la diana, mientras que una ausencia del constructo de unión a antígeno en la muestra puede indicar la ausencia de la diana.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno incluye un marcador detectable como se describe en la presente. Así, la presencia del constructo de unión a antígeno puede inferirse detectando el marcador detectable.

En algunas realizaciones, se usa un constructo secundario de unión a antígeno para detectar el constructo de unión a antígeno. El constructo secundario de unión a antígeno puede unirse específicamente al constructo de unión a antígeno. Por ejemplo, el constructo secundario de unión a antígeno puede incluir un anticuerpo policlonal o monoclonal, diabodino, minicuerpo, etc. contra el tipo de huésped del anticuerpo, o contra el propio constructo de unión a antígeno. El constructo secundario de unión a antígeno puede conjugarse con un marcador detectable como se describe en la presente. El constructo secundario de unión a antígeno puede aplicarse a la muestra. En algunas realizaciones, el constructo secundario de unión a antígeno se aplica a la muestra sustancialmente de la misma manera que el constructo de unión a antígeno. Por ejemplo, si el constructo de unión a antígeno se infundió en un sujeto, también puede infundirse en el sujeto el constructo secundario de unión a antígeno.

En algunas realizaciones, la unión o la ausencia de unión del constructo de unión a antígeno se detecta mediante por lo menos una de las siguientes técnicas: tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), resonancia magnética nuclear (NMR) o detección de emisiones de fluorescencia. La PET puede incluir, entre otras, imagenología PET en animales pequeños. En algunas realizaciones, la unión o la ausencia de unión del constructo de unión a antígeno se detecta mediante dos o más formas de imagenología. En algunas realizaciones, la detección puede ser a través del infrarrojo cercano (NIR) y/o Cerenkov.

En algunas realizaciones, es posible cualquier combinación de modalidades de imagenología, incluyendo, a modo de ejemplo, PET + NIR, PET + SPECT, etc.

Métodos para dirigir un agente terapéutico a una célula

Los constructos de unión a antígeno pueden usarse para dirigir una molécula terapéutica, por ejemplo una citotóxica, a una célula diana positiva, como una célula que expresa la molécula diana. Así, algunas realizaciones incluyen métodos para dirigir un agente terapéutico a una célula diana positiva. El método puede incluir la administración a un sujeto de un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente. El sujeto puede ser un sujeto con necesidad, por ejemplo un sujeto que necesita la eliminación o neutralización de por lo menos algunas células diana positivas. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno incluye por lo menos un agente terapéutico como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el agente terapéutico puede conjugarse directamente con el constructo de unión a antígeno mediante un enlace covalente, como un enlace disulfuro. En

algunas realizaciones, el sujeto puede beneficiarse de la ubicación de una célula positiva para la molécula diana a otra célula o agente.

Opcionalmente, antes y/o después de la administración del constructo de unión a antígeno que incluye por lo menos un agente terapéutico, se determina el número y/o localización de las células diana positivas del paciente. Por ejemplo, la determinación del número y/o localización de células diana positivas antes de la administración puede indicar si es probable que el paciente se beneficie de la neutralización y/o eliminación de las células diana positivas. La determinación del número y/o localización de las células diana positivas después de la administración puede indicar si se eliminaron en el paciente las células diana positivas.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno puede usarse como agente terapéutico como constructo independiente (por ejemplo, sin una toxina conjugada al mismo). Aunque los fragmentos tienen una vida media más corta en comparación con el anticuerpo intacto, lo que sería menos óptimo para la terapia, estos formatos pueden mostrar una penetración tumoral mejorada basada en su tamaño más pequeño y ser terapéuticamente eficaces cuando se arman adecuadamente con un fármaco citotóxico o radioisótopo.

En algunas realizaciones, otro enfoque terapéutico es la radioinmunoterapia mediante la fijación de un radiomarcador apropiado, como el yodo 131, un emisor beta, como el iridio 90, el lutecio 177, el cobre 67, la astatina 211, el plomo 212/bismuto 212, el actinio 225/bismuto 213 y el torio, que pueden causar daño y muerte celular.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se usa para dirigir células que expresan la molécula diana. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es apropiado para uno o más de un trastorno asociado con por lo menos uno de los siguientes: CD8, CD3, PSMA, PSCA, o 5T4, por ejemplo. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es apropiado para tratar uno o más de los siguientes trastornos:

Dianas/constructos específicos

En algunas realizaciones, pueden usarse cualquiera de las composiciones, métodos (por ejemplo, métodos de tratamiento, métodos de elaboración, métodos de detección, etc.), kits, agentes, modificaciones de constructos de unión a antígeno, líneas celulares, ácidos nucleicos, etc. proporcionados en la presente para cualquier molécula diana. En algunas realizaciones, la molécula diana puede ser una asociada con la inmunoterapia del cáncer. En algunas realizaciones, la molécula diana puede ser una o más de CD8, CD3, 5T4, PSCA o PSMA, incluyendo variantes de las mismas.

En algunas realizaciones, uno o más de los constructos de unión a antígeno, como el minicuerpo, pueden usarse para el tratamiento de un sujeto que tenga un trastorno asociado a la molécula diana. En algunas realizaciones, la molécula diana puede ser cualquier molécula diana para la que se tenga un constructo de unión a antígeno que se usa. En algunas realizaciones, la molécula diana puede ser por lo menos una de las siguientes: CD8, CD3, PSMA, PSCA, o 5T4, y por tanto, el trastorno a tratar puede ser uno relacionado con por lo menos uno de los siguientes: CD8, CD3, PSMA, PSCA o 5T4. En algunas realizaciones, pueden usarse uno o más de los constructos de unión a antígeno, como el minicuerpo, para el diagnóstico de un sujeto en cuanto a si padece o no un trastorno asociado a la molécula diana.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo pero no limitado a humanos, primates no humanos, roedores, perros, cerdos y similares.

Cada una de las secciones siguientes perfila varias realizaciones para algunos de los varios constructos de unión a antígeno proporcionados en la presente. Todas estas realizaciones se proporcionan como varias formas de constructos de unión a antígeno, incluyendo minicuerpos y scFvs. Las secciones siguientes se proporcionan explícitamente para realizaciones específicas de diana; sin embargo, se contemplan como aspectos que pueden combinarse con cualquiera de las opciones apropiadas proporcionadas en otras partes de la presente memoria descriptiva. Por lo tanto, las presentes realizaciones no son exclusivas de las otras realizaciones, sino que son opciones que pueden combinarse con cualquiera de las otras realizaciones proporcionadas en la presente. Por ejemplo, puede usarse cualquiera de las disposiciones de bisagra proporcionadas en la presente en uno o más de los constructos y/o métodos mencionados. De manera similar, las varias realizaciones descritas a continuación con respecto a cualquiera de las cinco dianas de CD8, CD3, PSMA, PSCA o 5T4 también pueden intercambiarse con las otras dianas mencionadas. Así, mientras que el análisis de PSCA se dirige a PSCA, se entenderá que las realizaciones también pueden aplicarse a constructos de CD8, CD3, PSMA o 5T4. De manera similar, las divulgaciones de CD8 también pueden aplicarse a CD3, PSMA, PSCA o 5T4, por ejemplo.

En algunas realizaciones, pueden usarse agentes quimioterapéuticos con uno o más de los constructos de CD8, CD3, PSMA, PSCA o 5T4 proporcionados en la presente. Los agentes quimioterapéuticos tienen a menudo naturaleza citotóxica o citostática y pueden incluir agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores mitóticos, terapia hormonal, agentes terapéuticos dirigidos y agentes inmunoterapéuticos. En algunas realizaciones, los agentes quimioterapéuticos que pueden usarse como agentes de

diagnóstico de acuerdo con las realizaciones de la divulgación incluyen, entre otros, ácido 13-cisretinoico, 2-clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina-D, adriamicina, aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, ácido todo-transretinoico, interferón alfa, altretamina, ametopterina, amifostina, anagrelida, anastrozol, arabinosilcitosina, trióxido de arsénico, amsacrina, aminocamptotecina, aminoglutetimida, asparaginasa, azacitidina, bacilo calmette-guerina (BCG), bendamustina, bevacizumab, bexaroteno, bicalutamida, bortezomib, bleomicina, busulfán, leucovorina cálcica, factor citrovorum, capecitabina, canertinib, carboplatino, carmustina, cetuximab, clorambucilo, cisplatino, cladribina, cortisona, ciclofosfamida, citarabina, darbepoetina alfa, dasatinib, daunomicina, decitabina, denileukina diftotox, dexametasona, dexasona, dexrazoxano, dactinomicina, daunorrubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, doxifluridina, eniluracilo, epirubicina, epoetina alfa, erlotinib, everolimus, exemestano, estramustina, etopósido, filgrastim, fluoximesterona, fulvestrant, flavopiridol, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab, ozogamicina, goserelina, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, hexametilmelamina, hidrocortisona hidroxideca, ibritumomab, interferón alfa, interleucina-2, interleucina-11, isotretinoína, ixabepilona, idarubicina, mesilato de imatinib, ifosfamida, irinotecán, lapatinib, lenalidomida, letrozol, leucovorina, leuprolida, Ara-C liposomal, lomustina, mecloretamina, megestrol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metilprednisolona, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nelarabina, nilutamida, octreotida, oprelvekin, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pemetrexed, panitumumab, interferón PEG, pegaspargasa, pegfilgrastim, PEG-L-asparaginasa, pentostatina, plicamicina, prednisolona, prednisona, procarbazona, raloxifeno, rituximab, romiplostim, raltrexed, sapacitabina, sargramostim, satraplatino, sorafenib, sunitinib, semustina, estreptozocina, tamoxifeno, tegafur, tegafur-uracilo, temsirolimus, temozolamida, teniposida, talidomida, tioguanina, tiotepa, topotecán, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, tretinoína, trinitrexato, alrubicina, vincristina, vinblastina, vindestina, vinorelbina, vorinostat o ácido zoledrónico.

En algunas realizaciones, uno o más de los constructos, por ejemplo, los constructos de unión a antígeno de CD8, CD3, PSMA, PSCA o 5T4, pueden unirse a través de una o más de las cisteínas en la bisagra a quelantes, fármacos o cualquiera de los otros componentes descritos en la presente.

PSCA-IAB1M

El antígeno de células madre de próstata (PSCA) es una glicoproteína de la superficie celular que se expresa en la próstata y la vejiga humanas normales y está sobreexpresada en los cánceres de próstata (40% de los tumores primarios y 60-100% de las metástasis en ganglios linfáticos y médula ósea). También está altamente expresada en los carcinomas transicionales de vejiga y en el carcinoma pancreático. Un ejemplo de proteína PSCA se muestra con la SEQ ID NO: 132. IG8, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PSCA específico para PSCA demostró actividad de direccionamiento antitumoral *in vivo* (Gu, Z. et al., "Anti-prostate stem cell antigen monoclonal antibody 1G8 induces cell death *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo* via a Fc-independent mechanism," Cancer Res., Vol. 65, Nº 20, págs. 9495-9500, 2005). Este anticuerpo se humanizó mediante injerto en un marco humano (Trastuzumab) y se denominó 2B3 (Olafsen, T. et al., "Targeting, imaging, and therapy using a humanized antiprostata stem cell antigen (PSCA) antibody," Immunotherapy, Vol. 30, No. 4, págs. 396-405, 2007).

En algunas realizaciones, las realizaciones que implican constructos de unión de antígeno a PSCA pueden proporcionar agentes que tienen propiedades farmacodinámicas apropiadas para dirigirse a y obtener imágenes de tumores que expresan PSCA. Existe un valor en el campo de los agentes eficaces para obtener imágenes de cánceres con sensibilidad y especificidad, en particular tumores en estadio temprano o con metástasis temprana de los que no pueden obtenerse imágenes por medios tradicionales. Como el PSCA es expresado en gran medida por la mayoría de los tumores de próstata, vejiga y páncreas, es una diana valiosa en la detección, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estos cánceres. Algunas de las realizaciones proporcionadas en la presente proporcionan constructos con características para la imagenología y direccionamiento de tumores. También pueden usarse para el direccionamiento tumoral de la terapia génica, la terapia de radioactividad, y pueden tener utilidad terapéutica por sí mismos.

En la presente se proporcionan constructos de unión a antígenos manipulados que reconocen un nuevo marcador de superficie celular en cánceres de próstata y otros cánceres con alta afinidad. Estos constructos de unión a antígeno manipulados genéticamente pueden adaptarse específicamente para su uso *in vivo* para el direccionamiento y la detección. El PSCA es altamente expresado por la mayoría de los tumores de próstata, vejiga y páncreas y es una diana prometedora. Las realizaciones proporcionadas en la presente describen una molécula innovadora con características óptimas para la imagenología tumoral. También puede ser útil para el direccionamiento de la terapia génica, la radiactividad o puede tener utilidad terapéutica por sí misma.

En algunas realizaciones, el PSCA al que se dirige el anticuerpo anti-PSCA es PSCA humano. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado puede usarse para dirigir la fracción efectora a una célula positiva para PSCA, particularmente células, que sobreexpresan la proteína PSCA. En algunas realizaciones, el PSCA a la que se dirige el anticuerpo anti-PSCA es PSCA humano.

En algunas realizaciones, los constructos proporcionados en la presente pueden proporcionar agentes que

tienen propiedades farmacodinámicas apropiadas para dirigirse y obtener imágenes de tumores que expresan PSCA. En algunas realizaciones, el minicuerpo proporciona un agente eficaz para obtener imágenes de cánceres con sensibilidad y especificidad, en particular de tumores en estadios tempranos o con metástasis tempranas de los que no pueden obtenerse por medios tradicionales.

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno que se unen al antígeno PSCA pueden ser anticuerpos, minicuerpos y/u otros fragmentos de anticuerpos como scFv. En las FIGS. 29B - 29D, 36E, 60 (SEQ ID NOs: 125 y 126), 61 (SEQ ID NO: 126), 62 (SEQ ID NO: 127), 63 (SEQ ID NO: 128), 64 (SEQ ID NO: 129), y 65A (SEQ ID NO: 130) se muestran algunas realizaciones no limitativas de constructos de unión a antígeno contra PSCA.

En algunas realizaciones, el constructo permite la imagenología del cáncer, en el diagnóstico precoz o el diagnóstico de la enfermedad metastásica. En particular, hay valor en mejores agentes para la imagenología de cáncer de próstata para la detección y estadificación. La imagenología del constructo de unión a antígeno PSCA será muy útil para la imagenología de metástasis óseas y evaluar la respuesta al tratamiento. En algunas realizaciones, se proporciona un método de detección del cáncer de páncreas. En algunas realizaciones, se adapta un minicuerpo manipulado de alta afinidad y altamente específico para el direccionamiento y detección *in vivo* de PSCA en pacientes con cáncer de próstata, cáncer de vejiga y cáncer de páncreas. En algunas realizaciones, un "trastorno dependiente de PSCA" puede incluir un tumor de próstata, un cáncer de próstata, un tumor de vejiga, un carcinoma transicional de la vejiga urinaria, un tumor pancreático, un carcinoma pancreático, cualquier tumor asociado con la expresión de PSCA, cualquier cáncer asociado con la expresión de PSCA, o cualquier trastorno asociado con la expresión de PSCA.

En algunas realizaciones, se proporciona un constructo de unión a antígeno PSCA de alta afinidad que puede usarse en el tratamiento y detección de cánceres que sobreexpresan PSCA.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno también puede enlazarse a agentes terapéuticos o marcadores detectables. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente citotóxico. Por ejemplo, el agente puede ser ricina, ricina de cadena A, doxorubicina, daunorrubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxi antracina diona, actinomicina D, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, mitogelina de gelonina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, calicheamicina, inhibidor de sapaonaria officinalis, maytansinoides o glucocorticoidicina. En otras realizaciones, el agente terapéutico es un isótopo radiactivo. El isótopo radiactivo puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en ^{212}Bi , ^{131}I , ^{111}In , ^{90}Y y ^{186}Re . En otras realizaciones, el constructo está enlazado a una enzima activadora de profármacos anticancerígenos capaz de convertir un profármaco en su forma activa.

En algunas realizaciones, el constructo anti-PSCA está marcado con un marcador detectable. El marcador puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante metálico o una enzima. Muchos radionúclidos pueden usarse como marcadores de imagenología, incluyendo sin limitación, ^{124}I , ^{86}Y , ^{18}F , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, y similares. Un experto en la técnica conocerá otros radionúclidos especialmente adecuados para su uso en la presente realización. En algunas realizaciones, el método puede matar la célula cancerosa. En algunas realizaciones, el constructo reconoce y se une a la proteína de PSCA como se muestra a continuación comenzando con leucina en la posición de aminoácido 22 y terminando con alanina en la posición de aminoácido 99. En realizaciones adicionales, el método comprende además administrar a un fármaco quimioterapéutico, radioterapia. En algunas realizaciones, el sujeto también se trata con terapia de ablación hormonal o terapia antagonista hormonal.

En algunas realizaciones, los tratamientos pueden administrarse al paciente o sujeto por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral o intradérmica. En algunas realizaciones, el contacto comprende administrar el constructo directamente en un cáncer de próstata, un cáncer de vejiga, un cáncer de páncreas o una metástasis de los mismos.

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos de detección de una célula cancerosa en un sujeto mediante el contacto de la célula cancerosa con un constructo que lleva un marcador detectable. Los métodos pueden usarse en el cribado de pacientes con mayor riesgo de cáncer o para monitorizar la respuesta a la terapia o para desarrollar un pronóstico para el cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata, vejiga o páncreas). Los métodos son particularmente ventajosos para detectar metástasis del cáncer. En la presente se proporcionan fragmentos de minicuerpos con aptitud para el direccionamiento/imagenología tumoral. En algunas realizaciones, con respecto a los constructos proporcionados en la presente, existe la condición de que el constructo comprenda un dominio VH o VL que no sea idéntico a un dominio correspondiente o al anticuerpo 2B3.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se conjuga con una fracción "efectora". La fracción efectora puede ser cualquier número de moléculas, incluyendo fracciones de marcado como marcadores radiactivos o marcadores fluorescentes, o puede ser una fracción terapéutica. En un aspecto, el anticuerpo modula la actividad de la proteína. Tales fracciones efectoras incluyen, entre otras, un fármaco antitumoral, una toxina, un agente radiactivo, una citoquina, un segundo anticuerpo o una enzima. Además, en la presente se proporcionan realizaciones

en las que el constructo de unión a antígeno está enlazado a una enzima que convierte un profármaco en un agente citotóxico. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, entre otros, ricina, doxorubicina, daunorrubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracina diona, actinomicina D, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, y glucocorticoides y otros agentes quimioterapéuticos, así como radioisótopos. Los marcadores detectables adecuados incluyen, entre otros, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante metálico o una enzima.

En algunas realizaciones, los constructos de proteína de unión a antígeno pueden usarse sistémicamente para tratar el cáncer solos o cuando se conjugan con una fracción efectora. Los constructos de direccionamiento de PSCA conjugados con agentes tóxicos, como la ricina, así como los anticuerpos no conjugados pueden ser agentes terapéuticos útiles dirigidos de manera natural a células cancerosas portadoras de PSCA. Tales constructos pueden ser útiles para bloquear la invasividad.

En algunas realizaciones, los constructos de proteína de unión a antígeno pueden usarse para tratar el cáncer. En tal situación, el constructo se une a por lo menos una porción funcionalmente activa de una segunda proteína o molécula tóxica que tenga actividad terapéutica. La segunda proteína puede incluir, entre otras, una enzima, una linfoquina, una oncostatina o una toxina. Las toxinas adecuadas incluyen doxorubicina, daunorrubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracina diona, actinomicina D, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, ricina, abrina, glucocorticoides y radioisótopos.

En algunas realizaciones, el tratamiento implicará generalmente la administración repetida de los constructos y sus inmunoconjugados a través de una vía de administración aceptable, como la inyección intravenosa (N), a una dosis eficaz. Las dosificaciones dependerán de varios factores generalmente apreciados por los expertos en la técnica incluyendo, sin limitación, el tipo de cáncer y la gravedad, grado o estadio del cáncer, la afinidad de unión y la semivida de los agentes utilizados, el nivel de concentración de anticuerpos en estado estacionario deseado, la frecuencia del tratamiento y la influencia de los agentes quimioterapéuticos usados en combinación con el método de tratamiento de las realizaciones proporcionadas en la presente. Las dosis diarias típicas pueden variar de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg. Las dosis en el intervalo de 10-500 mg de los constructos o sus inmunoconjugados por semana pueden ser eficaces y bien toleradas, aunque pueden ser apropiadas y/o bien toleradas incluso dosis semanales más altas. El principal factor determinante para definir la dosis adecuada es la cantidad de un agente particular necesaria para ser terapéuticamente eficaz en un contexto particular. Para lograr la inhibición o regresión tumoral pueden requerirse administraciones repetidas. Las dosis iniciales de carga pueden ser mayores. La dosis de carga inicial puede administrarse como infusión. Las dosis periódicas de mantenimiento pueden administrarse de manera similar, siempre que la dosis inicial sea bien tolerada.

En algunas realizaciones, también es posible la administración directa de los constructos y puede tener ventajas en ciertos contextos. Por ejemplo, para el tratamiento del carcinoma de vejiga, los agentes pueden inyectarse directamente en la vejiga.

En algunas realizaciones, las composiciones pueden administrarse para tratamientos terapéuticos o profilácticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que padece una enfermedad (por ejemplo, cáncer) en una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente. Pueden administrarse dosis únicas o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosificación y la frecuencia requeridas y toleradas por el paciente. Pueden usarse otras terapias contra el cáncer conocidas en combinación con los métodos proporcionados en la presente. Por ejemplo, las composiciones proporcionadas en la presente también pueden usarse para dirigir o sensibilizar una célula a otros agentes terapéuticos contra el cáncer, como 5FU, vinblastina, actinomicina D, cisplatino, metotrexato y similares.

En otras realizaciones, los métodos pueden ponerse en práctica junto con otras terapias contra el cáncer (por ejemplo, prostatectomía radical), radioterapia (haz externo o braquiterapia), terapia hormonal (por ejemplo, orquiectomía, terapia análoga a la LHRH para suprimir la producción de testosterona, terapia antiandrogénica) o quimioterapia.

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos de imagenología de células cancerosas o tumores *in vivo* mediante la administración de anticuerpos, como los minicuerpos proporcionados en la presente. En una realización, se proporciona un método de imagenología de una célula cancerosa *in vivo*, el método comprende administrar un anticuerpo anti-PSCA marcado a un mamífero y obtener imágenes del anticuerpo *in vivo*. Los métodos pueden usarse para obtener imágenes de una célula cancerosa en un mamífero, incluyendo sin limitación, un ratón, rata, hámster, conejo, cerdo, humano, y similares.

En algunas realizaciones, en la presente se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que tiene cáncer, o inhibir el crecimiento de una célula cancerosa de próstata que expresa una proteína Antígeno de Células Madres de

Próstata (PSCA) que comprende poner en contacto la célula cancerosa (por ejemplo, próstata, vejiga, célula cancerosa pancreática, con un constructo como se proporciona en la presente, en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de la célula cancerosa. En algunas realizaciones, los métodos encuentran aplicación particular en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de cánceres que sobreexpresan PSCA, por ejemplo, cánceres de próstata, páncreas y vejiga. En ciertas realizaciones, los métodos se aplican a cánceres refractarios a hormonas o resistentes a terapias. En ciertas realizaciones, los métodos se aplican a cánceres metastásicos.

En algunas realizaciones, se proporciona un minicuerpo que se une a PSCA. El minicuerpo comprende un polipéptido que comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que se une a PSCA, el scFv comprendiendo un dominio variable pesado (V_H) enlazado a un dominio variable ligero (V_L); y una región bisagra variante que comprende por lo menos tres cisteínas en cada cadena de la bisagra. En algunas realizaciones, el minicuerpo comprende además una secuencia C_{H3} de IgG humana. En algunas realizaciones, el minicuerpo comprende además un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en una sustancia radiactiva, un colorante, un agente de contraste, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, una enzima, un agente potenciador y una nanopartícula.

En algunas realizaciones, el minicuerpo proporcionado en el presente comprende: un HCDR1 de la HCDR1 en la SEQ ID NO: 93; una HCDR2 de la HCDR2 en la SEQ ID NO: 94; una HCDR3 de la HCDR3 en la SEQ ID NO: 95; una LCDR1 de la LCDR1 en la SEQ ID NO: 96; una LCDR2 de la LCDR2 en la SEQ ID NO: 97; y una LCDR3 de la LCDR3 en la SEQ ID NO: 98. En algunas realizaciones del minicuerpo proporcionado en la presente, el dominio variable pesado (V_H) y el dominio variable ligero (V_L) son secuencias humanas.

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona una línea celular que produce cualquiera de las realizaciones de minicuerpos descritas en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona un kit que comprende cualquiera de las realizaciones del minicuerpo descritas en la presente y un marcador detectable.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de PSCA. El método comprende aplicar cualquiera de las realizaciones de minicuerpos proporcionadas en la presente a una muestra; y detectarla unión o ausencia de unión del constructo de unión a antígeno del mismo a PSCA. En algunas realizaciones del método, el minicuerpo comprende un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en una sustancia radiactiva, un colorante, un agente de contraste, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, una enzima, un agente potenciador y una nanopartícula. En algunas realizaciones del método, la aplicación del minicuerpo comprende administrar el minicuerpo a un sujeto. En algunas realizaciones del método, la detección de la unión o ausencia de unión del minicuerpo del mismo a un antígeno diana comprende tomografía por emisión de positrones. En algunas realizaciones, el método comprende además aplicar un anticuerpo secundario o fragmento del mismo a la muestra, en donde el anticuerpo secundario o fragmento del mismo se une específicamente al minicuerpo. En algunas realizaciones del método, el minicuerpo del mismo se incuba con la muestra durante no más de 1 hora.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para dirigir un agente terapéutico a PSCA. El método comprende administrar a un sujeto de cualquiera de las realizaciones del minicuerpo proporcionado en la presente, en donde el minicuerpo se conjuga con un agente terapéutico.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para dirigir PSCA en un sujeto con necesidad de ello. El método comprende administrar al sujeto un minicuerpo de cualquiera de las realizaciones proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones del método, el sujeto tiene por lo menos uno o más de un tumor de próstata, un cáncer de próstata, un tumor de vejiga, un carcinoma transicional de la vejiga urinaria, un tumor pancreático, un carcinoma pancreático, cualquier tumor asociado con la expresión de PSCA, cualquier cáncer asociado con la expresión de PSCA, o cualquier trastorno asociado con la expresión de PSCA.

En algunas realizaciones, se proporciona un constructo de unión a antígeno (como un minicuerpo o scFv) que se une a PSCA, el constructo de unión a antígeno (como un minicuerpo o scFv) que comprende una región bisagra, en donde la región bisagra comprende por lo menos uno de los siguientes: a) una secuencia peptídica de la SEQ ID NO: 1 ($X_{n1}CX_{n2}X_{n3}CX_{n4}X_{n5}C$), en donde X_{n1} puede ser cualquier aminoácido que no forme un enlace de reticulación covalente, en donde X_{n2} es uno de: A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, o V, en donde X_{n3} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n4} puede ser cualquier aminoácido, y en donde X_{n5} puede ser cualquier aminoácido; b) una secuencia peptídica de la SEQ ID NO: 2 ($X_{n1}X_{n2}X_{n3}X_{n4}X_{n5}X_{n6}CX_{n7}X_{n8}CX_{n9}X_{n10}C$), en donde X_{n1} puede ser cualquier aminoácido que no forme un enlace de reticulación covalente con otro aminoácido idéntico, en donde X_{n2} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n3} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n4} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n5} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n6} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n7} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n8} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n9} puede ser cualquier aminoácido, y en donde X_{n10} puede ser cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 208); c) una secuencia de bisagra central de por lo menos uno de: CVECPPCP (SEQ ID NO: 57), CPPCPPC (SEQ ID NO: 52), o CPPCPPPPC (SEQ ID NO: 54), enlazada a una secuencia de bisagra superior de ELKTPGLGDTTHT (SEQ ID NO: 48); o d) una región

bisagra superior que no comprende aminoácidos capaces de reticularse con un aminoácido correspondiente, y una región bisagra central conectada a un extremo C-terminal de la región bisagra superior, en donde la región bisagra central comprende por lo menos tres cisteínas. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno es un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un minicuerpo. En algunas realizaciones del constructo de unión a antígeno (como un minicuerpo o scFv), aparte de la región bisagra, el constructo de unión a antígeno (como un minicuerpo o scFv) comprende una secuencia de aminoácidos humanizada. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno (como un minicuerpo o scFv) comprende: una HCDR1 de la HCDR1 en la SEQ ID NO: 93; una HCDR2 de la HCDR2 en la SEQ ID NO: 94; una HCDR3 de la HCDR3 en la SEQ ID NO: 95; una LCDR1 de la LCDR1 en la SEQ ID NO: 96; una LCDR2 de la LCDR2 en la SEQ ID NO: 97; y una LCDR3 de la LCDR3 en la SEQ ID NO: 98. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno (como un minicuerpo o scFv) comprende una secuencia de aminoácidos humanizada.

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica la región bisagra de cualquiera de las realizaciones de constructo de unión a antígeno (como un minicuerpo o scFv) descritas en la presente. En algunas realizaciones del ácido nucleico, aparte de la secuencia que codifica la región bisagra, el ácido nucleico comprende una secuencia humana. En algunas realizaciones, se proporciona una línea celular que expresa el constructo de unión a antígeno (como un minicuerpo o scFv) codificado por el ácido nucleico.

En algunas realizaciones, se proporciona un método de elaboración del constructo de unión a antígeno (como un minicuerpo o scFv) de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente, el método comprendiendo expresar el anticuerpo en una línea celular.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar una afección en un sujeto con necesidad de ello, el método comprendiendo administrar al sujeto el anticuerpo de cualquiera de las realizaciones proporcionadas en la presente.

PSMA-IAB2M

Se han desarrollado anticuerpos de longitud completa que se dirigen a PSMA, algunos de los cuales se encuentran en varias etapas de desarrollo preclínico y clínico. El PSMA fue definido originalmente por un anticuerpo murino (mAb), 7E11, que reconocía un epítipo intracelular del PSMA (Olson, W. C. et al., "Clinical trials of cancer therapies targeting prostate-specific membrane antigen," Rev. Recent Clin. Trials, Vol. 2, N° 3, págs. 182-190, 2007). El mAb 7E11 se convirtió posteriormente en un agente de imagenología SPECT aprobado por la FDA llamado Proscint para la detección e imagenología del cáncer de próstata en tejidos blandos. Sin embargo, como 7E11 reconoce un epítipo intracelular, el Proscint es un agente de imagenología relativamente pobre que se limita a detectar tejido tumoral necrótico (Olson, W. C. et al., 2007). Al tener las propiedades farmacocinéticas de un anticuerpo de longitud completa, el Proscint también requiere un largo periodo de tiempo entre la inyección y la imagenología. Además, el Proscint es un anticuerpo murino que provoca fuertes respuestas inmunitarias que impiden la dosificación múltiple (Olson, W. C. et al., 2007).

Se descubrió otro anticuerpo de longitud completa que se dirige a PSMA, J591, y posteriormente se desinmunizó, la versión desinmunizada conocida como huJ591 (Liu, H. et al., "Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium", Cancer Research, Vol. 57, N° 17, págs. 3629-3634, 1997; Bander, N. H. et al., "Targeting Metastatic Prostate Cancer with Radiolabeled Monoclonal Antibody J591 to the Extracellular Domain of Prostate Specific Membrane Antigen", J. Urol., Vol. 170, N° 5, págs. 1717-1721, 2003). El huJ591 desinmunizado es un anticuerpo anti PSMA humano que reconoce y se une a un epítipo extracelular del PSMA (Bander, N. H. et al., 2003). El anticuerpo huJ591 se está desarrollando como posible agente de radioinmunoterapia contra el cáncer de próstata. En ensayos de fase I, el anticuerpo huJ591 conjugado con DOTA y marcado con isótopos emisores de rayos gamma Indio-111 y Lutecio-177 demostró un excelente direccionamiento hacia los sitios metastásicos, sin inmunogenicidad, y las dosis múltiples fueron bien toleradas (Bander, N. H. et al., 2003; Milowsky, M. I. et al., "Phase I Trial of yttrium-90-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for androgen-independent prostate cancer," J. Clin. Oncol., Vol. 22, N° 13, págs. 2522-2531, 2004; Bander, N. H. et al., "Phase I trial of 177 Lutetium-labeled J591, a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen, in patients with androgen-independent prostate cancer," J. Clin. Oncol., Vol. 23, N° 21, págs. 4591-4601, 2005; Olson, W. C. et al., 2007). Más allá del cáncer de próstata, los estudios de fase I con ¹¹¹In-DOTA huJ591 demostraron direccionamiento específico de la neovascularización tumoral de tumores sólidos avanzados (Milowsky, M. I. et al., "Vascular targeted therapy with anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 in advanced solid tumors," J. Clin. Oncol., Vol. 25, No. 5, págs. 540-547, 2007).

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno que se unen al antígeno PSMA pueden ser anticuerpos, minicuerpos y/u otros fragmentos de anticuerpos como scFv. En las FIGS. 5B - 5E, 7C - 7E, 21B - 21E, 34A - 34F, 35A - 35C, 36A, 47 (SEQ ID NOs: 112 y 113), 48 (SEQ ID NO: 113), 49 (SEQ ID NO: 114), 50 (SEQ ID NO: 115), 51 (SEQ ID NO: 116), 52 (SEQ ID NO: 117), 53 (SEQ ID NO: 118) se muestran algunas realizaciones no limitativas de constructos de unión a antígeno contra PSMA.

El antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), un biomarcador de la superficie celular que está asociado al cáncer de próstata (Slovin, S. F., "Targeting novel antigens for prostate cancer treatment: focus on prostate-specific membrane antigen," Expert Opin. Ther. Targets, Vol. 9, Nº 3, págs. 561-570, 2005), es una proteína transmembrana de tipo II de paso único que posee actividad de glutamato carboxipeptidasa, aunque el papel funcional del PSMA no está bien entendido (Olson, W. C. et al., 2007). La expresión de PSMA es relativamente limitada en tejidos normales fuera de la próstata, incluyendo el cerebro, el intestino delgado, el hígado, los túbulos renales proximales y la glándula salival (Olson, W. C. et al., 2007). Un ejemplo de proteína PSMA se muestra con la SEQ ID NO: 131.

En algunas realizaciones, en la presente se proporcionan constructos de unión a antígeno, como minicuerpos, que se dirigen al antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El constructo de unión a antígeno PSMA del mismo puede conjugarse con una sustancia como un agente de diagnóstico, un agente terapéutico o una nanopartícula para formar un conjugado anti-PSMA. También se divulgan métodos que incluyen el uso del constructo de unión al antígeno PSMA o el conjugado anti-PSMA para diagnosticar, visualizar, monitorizar o tratar el cáncer u otras afecciones asociadas con la sobreexpresión de PSMA.

En la presente se proporcionan constructos de unión a antígeno PSMA de acuerdo con las realizaciones descritas en la presente. Un constructo de unión a antígeno PSMA es una molécula que incluye una o más porciones de una inmunoglobulina o molécula relacionada con inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactiva con un PSMA.

El constructo de unión a antígeno PSMA o el conjugado anti-PSMA pueden usarse para dirigirse a una célula positiva para PSMA, como las células cancerosas que sobreexpresan PSMA.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para diagnosticar un cáncer asociado con la expresión de PSMA en un sujeto. Dicho método incluye administrar un minicuerpo anti-PSMA conjugado con un agente de diagnóstico a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un cáncer asociado con la expresión de PSMA; exponer al sujeto a un método de imagenología para visualizar el minicuerpo marcado *in vivo*; y determinar que el sujeto tiene un cáncer asociado con la expresión de PSMA cuando el minicuerpo marcado se localiza en un sitio del tumor.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar un cáncer asociado con la expresión de PSMA en un sujeto. Algunas realizaciones incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica al sujeto, la composición comprendiendo un minicuerpo anti-PSMA. En algunas realizaciones, el minicuerpo anti-PSMA se conjuga con un agente terapéutico.

En algunas realizaciones, el conjugado anti-PSMA puede incluir un constructo de unión a antígeno PSMA (como un minicuerpo o scFv) conjugado con un agente terapéutico. Un "agente terapéutico" como se usa en la presente es un átomo, molécula o compuesto que es útil en el tratamiento del cáncer u otras afecciones asociadas con PSMA. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, entre otros, fármacos, agentes quimioterapéuticos, constructos de unión a antígenos terapéuticos, toxinas, radioisótopos, enzimas (por ejemplo, enzimas para escindir profármacos a un agente citotóxico en el lugar del tumor), nucleasas, hormonas, inmunomoduladores, oligonucleótidos antisentido, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos y colorantes.

Los agentes quimioterapéuticos son a menudo de naturaleza citotóxica o citostática y pueden incluir agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores mitóticos, terapia hormonal, agentes terapéuticos dirigidos y agentes inmunoterapéuticos. En algunas realizaciones, los agentes quimioterapéuticos que pueden usarse como agentes de diagnóstico de acuerdo con las realizaciones de la divulgación incluyen, entre otros, ácido 13-cisretinoico, 2-clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina-D, adriamicina, aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, ácido alfa-transretinoico, interferón alfa, altretamina, ametopterina, amifostina, anagrelida, anastrozol, arabinosilicetina, trióxido de arsénico, amsacrina, aminocampotecina, aminoglucetimidina, asparaginasa, azacitidina, bacilo Calmette-Guérin (BCG), bendamustina, bevacizumab, bexaroteno, bicalutamida, bortezomib, bleomicina, busulfán, leucovorina cálcica, factor citrovorum, capecitabina, canertinib, carboplatino, carmustina, cetuximab, clorambucilo, cisplatino, cladribina, cortisona, ciclofosfamida, citarabina, darbepoetina alfa, dasatinib, daunomicina, decitabina, denileukina difitox, dexametasona, dexasona, dexrazoxano, dactinomicina, daunorubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, doxifluridina, eniluracilo, epirubicina, epoetina alfa, erlotinib, everolimus, exemestano, estramustina, etopósido, filgrastim, flouximesterona, fulvestrant, flavopiridol, flouxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab, ozogamicina, goserelina, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, hexametilmelamina, hidrocortisona, hidroxiurea, ibritumomab, interferón alfa, interleucina-2, interleucina-11, isotretinoína, ixabepilona, idarubicina, mesilato de imatinib, ifosfamida, irinotecán, lapatinib, lenalidomida, letrozol, leucovorina, leuprolida, Ara-C liposomal, lomustina, mecloretamina, megestrol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metilprednisolona, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nelarabina, nilutamida, octreotida, oprelvekin, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pemetrexed, panitumumab, PEG-interferón, pegaspargasa, pegfilgrastim, PEG-L-asparaginasa, pentostatina, plicamicina, prednisolona, prednisona, procabazina, raloxifeno, rituximab, romiplostim, raltrexed, sapacitabina, sargramostim, satraplatino, sorafenib, sunitinib, semustina,

estreptozocina, tamoxifeno, tegafur, tegafur-uracilo, temsirolimus, temozolamida, teniposida, talidomida, tioguanina, tiotepa, topotecán, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, tretinoína, trinitrexato, alrubicina, vincristina, vinblastina, vindestina, vinorelbina, vorinostat o ácido zoledrónico.

5 Los anticuerpos terapéuticos y fragmentos funcionales de los mismos, que pueden usarse como agentes de diagnóstico de acuerdo con las realizaciones de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, edrecolomab, gemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, panitumumab, rituximab, tositumomab y trastuzumab.

10 El constructo de unión a antígeno PSMA o el conjugado anti-PSMA pueden usarse para dirigirse a una célula positiva para PSMA, como células cancerosas que sobreexpresan PSMA. Por lo tanto, los métodos para diagnosticar, detectar, visualizar, monitorizar o tratar un cáncer u otra afección asociada con la expresión de PSMA pueden incluir administrar el constructo de unión a antígeno PSMA o el conjugado anti-PSMA a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un cáncer u otra afección asociada con la expresión de PSMA.

15 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar el cáncer u otra afección asociada con la sobreexpresión de PSMA. Tales métodos incluyen administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que incluye un constructo de unión a antígeno PSMA como se describe en la presente. En una realización, el constructo de unión a antígeno PSMA es un minicuerpo, derivado de un anticuerpo de J591 como los minicuerpos de J591 descritos en la presente.

20 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede incluir un conjugado terapéutico anti-PSMA, en donde el conjugado incluye un constructo de unión a antígeno PSMA conjugado con uno o más agentes terapéuticos como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno PSMA, derivado de un anticuerpo de J591 como los minicuerpos de J591 descritos en la presente. Por ejemplo, los minicuerpos de J591 descritos en la presente pueden usarse en un enfoque de radioinmunoterapia, en donde uno o más de los minicuerpos de J591 se radiomarcen con un radiomarcador emisor beta apropiado, como el itrio-90. El minicuerpo o minicuerpos de J591 radiomarcados pueden usarse para causar daño y muerte celular en el tejido canceroso local que expresa PSMA. Además, el uso de minicuerpos de J591 radiomarcados mostrará probablemente una penetración tumoral mejorada en comparación con el anticuerpo de huJ591 original de longitud completa radiomarcado.

25 El conjugado terapéutico anti-PSMA puede conjugarse o asociarse con una o más sustancias adicionales descritas en la presente, como conjugados de diagnóstico anti-PSMA (descritos en la presente), agentes de diagnóstico no conjugados, soluciones de contraste, lípidos portadores o nanopartículas.

30 La expresión de PSMA en el cáncer de próstata aumenta con la agresividad tumoral y es máxima en tumores de alto grado, lesiones metastásicas y enfermedad independiente de andrógenos (Olson, W. C. et al., 2007). Por lo tanto, el PSMA es un biomarcador del cáncer que es un buen candidato para ser dirigido por un agente de imagenología. La expresión de PSMA también está regulada por incremento en la neovascularización de muchos tumores sólidos no prostáticos, como carcinomas de pulmón, colon, mama, riñón, hígado y páncreas, así como sarcomas y melanomas (Olson, W. C. et al., 2007).

35 El cáncer asociado con la expresión de PSMA en un sujeto puede ser cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas o melanoma. Por tanto, en algunas realizaciones, el "trastorno dependiente de PSMA" puede incluir: cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas o melanoma.

40 Además, el "trastorno dependiente de PSMA" también puede incluir aquellos cánceres que están asociados con la expresión de PSMA, incluyendo aquellos que tienen un tejido tumoral canceroso que sobreexpresa PSMA (por ejemplo, cáncer de próstata) o aquellos que tienen neovascularización de tumor sólido que sobreexpresa PSMA (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon (o colorrectal), cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de vejiga y cáncer de páncreas, así como sarcomas y melanoma). La mayor parte de la neovascularización de los tumores sólidos expresa PSMA, lo que hace de PSMA un biomarcador de neovascularización. Por tanto, además de las células cancerosas que expresan PSMA, un cáncer que se asocia con la expresión de PSMA puede incluir cualquier tejido canceroso con neovascularización incluyendo, entre otros, carcinomas como el cáncer de próstata, el cáncer de pulmón, el cáncer de colon (o colorrectal), el cáncer de mama, el cáncer renal, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga y el cáncer de páncreas, así como sarcomas y melanoma.

45 En algunas realizaciones, se proporciona un minicuerpo que se une a PSMA. El minicuerpo comprende un polipéptido que comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que se une a PSMA, el scFv que comprende un dominio variable pesado (V_H) enlazado a un dominio variable ligero (V_L); y una región bisagra variante que comprende por lo menos tres cisteínas en cada cadena de la bisagra. En algunas realizaciones, el minicuerpo comprende además una secuencia C_{H3} de IgG humana. En algunas realizaciones, el minicuerpo comprende además un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en una sustancia radiactiva, un colorante, un agente de contraste, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, una enzima, un agente potenciador y una

nanopartícula.

En algunas realizaciones, el minicuerpo proporcionado en el presente comprende: una HCDR1 de la HCDR1 en la SEQ ID NO: 81; una HCDR2 de la HCDR2 en la SEQ ID NO: 82; una HCDR3 de la HCDR3 en la SEQ ID NO: 83; una LCDR1 de la LCDR1 en la SEQ ID NO: 84; una LCDR2 de la LCDR2 en la SEQ ID NO: 85; y una LCDR3 de la LCDR3 en la SEQ ID NO: 86. En algunas realizaciones del minicuerpo proporcionado en la presente, el dominio variable pesado (V_H) y el dominio variable ligero (V_L) son secuencias humanas.

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona una línea celular que produce cualquiera de las realizaciones de minicuerpos descritas en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona un kit que comprende cualquiera de las realizaciones de minicuerpos descritas en la presente y un marcador detectable.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de PSMA. El método comprende: aplicar cualquiera de las realizaciones de minicuerpos proporcionadas en la presente a una muestra; y detectar una unión o una ausencia de unión del constructo de unión a antígeno de las mismas a PSMA. En algunas realizaciones del método, el minicuerpo comprende un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en una sustancia radiactiva, un colorante, un agente de contraste, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, una enzima, un agente potenciador y una nanopartícula. En algunas realizaciones del método, la aplicación del minicuerpo comprende la administración del minicuerpo a un sujeto. En algunas realizaciones del método, la detección de la unión o ausencia de unión del minicuerpo al antígeno diana comprende tomografía por emisión de positrones. En algunas realizaciones, el método comprende además aplicar un anticuerpo secundario o fragmento del mismo a la muestra, en donde el anticuerpo secundario o fragmento del mismo se une específicamente al minicuerpo. En algunas realizaciones del método, el minicuerpo se incuba con la muestra durante no más de 1 hora.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para dirigir un agente terapéutico a PSMA. El método comprende administrar a un sujeto cualquiera de las realizaciones del minicuerpo proporcionado en la presente, en donde el minicuerpo se conjuga con un agente terapéutico.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para dirigirse a PSMA en un sujeto con necesidad de ello. El método comprende administrar al sujeto un minicuerpo de cualquiera de las realizaciones proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones del método, el sujeto tiene por lo menos uno de un tumor o un cáncer o un trastorno de próstata, cerebro, intestino delgado, hígado, túbulos renales proximales, glándula salival. En algunas realizaciones, se proporciona un método para dirigirse a PSMA en una neovascularización tumoral de un tumor sólido avanzado.

En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a PSMA. El anticuerpo comprende una región bisagra, en donde la región bisagra comprende por lo menos uno de los siguientes: a) una secuencia peptídica de la SEQ ID NO: 1 ($X_{n1}CX_{n2}X_{n3}CX_{n4}X_{n5}C$), en donde X_{n1} puede ser cualquier aminoácido que no forme un enlace de reticulación covalente, en donde X_{n2} es uno de: A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, o V, en donde X_{n3} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n4} puede ser cualquier aminoácido, y en donde X_{n5} puede ser cualquier aminoácido; b) una secuencia peptídica de la SEQ ID NO: 2 ($X_{n1}X_{n2}X_{n3}X_{n4}X_{n5}X_{n6}CX_{n7}X_{n8}CX_{n9}X_{n10}C$), en donde X_{n1} puede ser cualquier aminoácido que no forme un enlace de reticulación covalente con otro aminoácido idéntico, en donde X_{n2} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n3} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n4} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n5} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n6} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n7} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n8} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n9} puede ser cualquier aminoácido, y en donde X_{n10} puede ser cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 208); c) una secuencia de bisagra central de por lo menos una de: CVECPPCP (SEQ ID NO: 57), CPPCPPC (SEQ ID NO: 52), o CPPCPPCPPC (SEQ ID NO: 54), enlazada a una secuencia de bisagra superior de ELKTPGLGDTTHT (SEQ ID NO: 48); o d) una región bisagra superior que no comprende aminoácidos capaces de reticularse con un aminoácido correspondiente, y una región bisagra central conectada a un extremo C-terminal de la región bisagra superior, en donde la región bisagra central comprende por lo menos tres cisteínas. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un minicuerpo. En algunas realizaciones del anticuerpo, aparte de la región bisagra, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos humanizada. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende: una HCDR1 de la HCDR1 de la SEQ ID NO: 81; una HCDR2 de la HCDR2 de la SEQ ID NO: 82; una HCDR3 de la HCDR3 de la SEQ ID NO: 83; una LCDR1 de la LCDR1 de la SEQ ID NO: 84; una LCDR2 de la LCDR2 de la SEQ ID NO: 85; y una LCDR3 de la LCDR3 de la SEQ ID NO: 86.

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica la región bisagra de cualquiera de las realizaciones de anticuerpos descritas en la presente. En algunas realizaciones del ácido nucleico, aparte de la secuencia que codifica la región bisagra, el ácido nucleico comprende una secuencia humana. En algunas realizaciones, se proporciona una línea celular que expresa el anticuerpo codificado por el ácido nucleico.

En algunas realizaciones, se proporciona un método de fabricación del anticuerpo de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente, el método comprendiendo la expresión del anticuerpo en una línea celular.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar una afección en un sujeto con necesidad de ello, el método comprendiendo administrar al sujeto el anticuerpo de cualquiera de las realizaciones proporcionadas en la presente.

CD8-IAB22M

CD8 (cúmulo de diferenciación 8) es una glicoproteína transmembrana que es un marcador específico de una subclase de células T, incluyendo las células T citotóxicas. La expresión de CD8 también está presente en algunas células asesinas naturales y dendríticas, así como en un subconjunto de linfomas de células T. CD8 se ensambla como un heterodímero de las subunidades CD8 alfa y CD8 beta o como un homodímero CD8 alfa. El complejo CD8 dimérico ensamblado actúa como correceptor junto con el receptor de células T (TCR) para reconocer la presentación de antígenos por parte de las células MHC de clase I. CD8 desempeña una función en el desarrollo de las células T y en la activación de las células T maduras. Los cambios en la localización de las células T pueden reflejar la progresión de una respuesta inmunitaria y pueden producirse a lo largo del tiempo. Ejemplos de subunidades de CD8 se muestran con las SEQ ID NO: 134 y 135.

En la presente se describen constructos de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, como minicuerpos que se unen a una molécula diana, CD8. En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno que se unen al antígeno de CD8 pueden ser anticuerpos, minicuerpos y/u otros fragmentos de anticuerpos como scFv. Algunas realizaciones de constructos de unión a antígeno contra CD8 se muestran en las FIGS. 14E, 15D, 16B - 16D, 20C - 20G, 22B, 36B, 40 (SEQ ID NO: 105 y 106), 41 (SEQ ID NO: 106), 42 (SEQ ID NO: 107), 43 (SEQ ID NO: 108), 44 (SEQ ID NO: 109), 45 (SEQ ID NO: 110), 46 (SEQ ID NO: 111), 66.

Algunas realizaciones proporcionadas en la presente se refieren a un método para dirigir un agente terapéutico a un aCD8. El método puede incluir administrar a un sujeto un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente, por ejemplo un constructo de unión a antígeno de CD8. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se conjuga con un agente terapéutico.

Los constructos de unión a antígeno pueden ser útiles para detectar la presencia, localización y/o cantidades de la molécula diana (células CD8 y/o CD8+, por ejemplo, ciertas clases de células T). Tales constructos de unión a antígeno también pueden ser útiles para dirigir agentes terapéuticos a células que expresan la molécula diana. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para detectar la presencia o ausencia de la molécula diana (o "diana") usando constructos de unión a antígeno (incluyendo anticuerpos y constructos como minicuerpos). En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para usar los constructos de unión a antígeno con propósitos terapéuticos.

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno permiten la detección de CD8 humano, que es un biomarcador específico que se encuentra en la superficie de un subconjunto de células T para la imagenología de diagnóstico del sistema inmunitario. La imagenología de CD8 permite la detección *in vivo* de la localización de células T. Los cambios en la localización de las células T pueden reflejar la progresión de una respuesta inmunitaria y pueden producirse a lo largo del tiempo como resultado de varios tratamientos terapéuticos o incluso estados de enfermedad.

Además, CD8 desempeña una función en la activación de vías de señalización descendentes que son importantes para la activación de células T citolíticas que funcionan para depurar patógenos virales y proporcionar inmunidad a los tumores. Las células T positivas para CD8 pueden reconocer péptidos cortos presentados dentro de la proteína MHC I de las células presentadoras de antígenos. En algunas realizaciones, los fragmentos manipulados dirigidos a CD8 pueden potenciar la señalización a través del receptor de células T y mejorar la capacidad de un sujeto para depurar patógenos víricos y responder a antígenos tumorales. Por tanto, en algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno proporcionadas en la presente pueden ser agonistas y activar la diana CD8.

En algunas realizaciones, se detecta la presencia o ausencia de la diana, CD8. La presencia o ausencia de la diana puede detectarse basándose en la presencia o ausencia del constructo de unión a antígeno en la muestra. Después de la retirada y/o eliminación del constructo de unión a antígeno de la muestra, por ejemplo mediante lavado y/o eliminación metabólica, el constructo de unión a antígeno restante en la muestra puede indicar la presencia de la diana, mientras que una ausencia del constructo de unión a antígeno en la muestra puede indicar la ausencia de la diana.

Algunas realizaciones incluyen la detección de CD8 humano, que es un biomarcador específico que se encuentra en la superficie de un subconjunto de células T para la imagenología de diagnóstico del sistema inmunitario. La imagenología de la molécula diana puede permitir la detección *in vivo* de la localización de las células T. Los cambios en la localización de las células T pueden reflejar la progresión de una respuesta inmunitaria y pueden producirse a lo largo del tiempo como resultado de varios tratamientos terapéuticos o incluso estados de enfermedad. Por ejemplo, la imagenología de la localización de las células T puede ser útil en inmunoterapia. La inmunoterapia adoptiva es una forma de terapia en la que las células T del propio paciente se manipulan *in vitro* y se reintroducen en el paciente. Para esta forma de tratamiento, la imagenología de las células T puede ser útil para monitorizar y/o

determinar el estado del tratamiento. Así, en algunas realizaciones, la monitorización de la localización de la molécula diana puede ser útil para analizar un mecanismo de acción, eficacia y/o seguridad en el desarrollo de fármacos y/o puede ayudar en el tratamiento clínico de la enfermedad.

5 Algunas realizaciones proporcionadas en la presente se refieren a un método para dirigir un agente terapéutico a un CD8. El método puede incluir administrar a un sujeto un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente, por ejemplo un constructo de unión a antígeno de CD8. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se conjuga con un agente terapéutico.

10 Las toxinas que pueden usarse como marcadores detectables de acuerdo con las realizaciones de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, ricina, abrina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina estafilocócica-A, proteína antiviral de *Phytolacca americana*, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*.

15 En algunas realizaciones, las nanopartículas se usan en aplicaciones terapéuticas como portadores de fármacos que, cuando se conjugan con un constructo de unión a antígeno, administran agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos, toxinas o cualquier otro agente citotóxico o anticanceroso conocido en la técnica a células cancerosas que sobreexpresan la diana en la superficie celular.

20 Los constructos de unión a antígeno pueden usarse para dirigir una molécula terapéutica, por ejemplo una citotoxina, a una célula diana positiva, como una célula que expresa CD8. Por tanto, algunas realizaciones incluyen métodos para dirigir un agente terapéutico a una célula diana positiva. El método puede incluir la administración a un sujeto de un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente. El sujeto puede ser un sujeto que necesita, por ejemplo un sujeto que necesita la eliminación o neutralización de por lo menos algunas células diana positivas. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno incluye por lo menos un agente terapéutico como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el agente terapéutico puede conjugarse directamente con el constructo de unión a antígeno mediante un enlace covalente, como un enlace disulfuro. En algunas realizaciones, el sujeto puede beneficiarse de la localización de una célula CD8 positiva para otra célula o agente.

30 Opcionalmente, antes y/o después de la administración del constructo de unión a antígeno que incluye por lo menos un agente terapéutico, se determina el número y/o localización de las células diana positivas del paciente. Por ejemplo, la determinación del número y/o localización de células diana positivas antes de la administración puede indicar si es probable que el paciente se beneficie de la neutralización y/o eliminación de las células diana positivas. La determinación del número y/o localización de las células diana positivas después de la administración puede indicar si fueron eliminadas en el paciente las células diana positivas.

35 El término "trastorno dependiente de CD8" incluye cánceres para los que existe un componente inmunológico (incluyendo la respuesta a inmunoterapias contra el cáncer), trastornos autoinmunes, trastornos de inflamación, etc.

40 En algunas realizaciones, se proporciona un minicuerpo que se une a CD8. El minicuerpo comprende un polipéptido que comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que se une a CD8, el scFv que comprende un dominio variable pesado (V_H) unido a un dominio variable ligero (V_L); y una región bisagra variante que comprende por lo menos tres cisteínas en cada cadena de la bisagra. En algunas realizaciones, el minicuerpo comprende además una secuencia C_H3 de IgG humana. En algunas realizaciones, el minicuerpo comprende además un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en una sustancia radiactiva, un colorante, un agente de contraste, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, una enzima, un agente potenciador y una nanopartícula.

45 En algunas realizaciones, el minicuerpo proporcionado en el presente comprende: una HCDR1 de la HCDR1 en la SEQ ID NO: 75; una HCDR2 de la HCDR2 en la SEQ ID NO: 76; una HCDR3 de la HCDR3 en la SEQ ID NO: 77; una LCDR1 de la LCDR1 en la SEQ ID NO: 78; una LCDR2 de la LCDR2 en la SEQ ID NO: 79; y una LCDR3 de la LCDR3 en la SEQ ID NO: 80. En algunas realizaciones del minicuerpo proporcionado en la presente, el dominio variable pesado (V_H) y el dominio variable ligero (V_L) son secuencias humanas.

50 En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona una línea celular que produce cualquiera de las realizaciones de minicuerpos descritas en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona un kit que comprende cualquiera de las realizaciones del minicuerpo descritas en la presente y un marcador detectable.

55 En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de CD8. El método comprende: aplicar cualquiera de las realizaciones de minicuerpos proporcionadas en la presente a una muestra; y detectar una unión o una ausencia de unión del constructo de unión a antígeno de las mismas a CD8. En algunas realizaciones del método, el minicuerpo comprende un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en una sustancia radiactiva, un colorante, un agente de contraste, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, una enzima, un agente potenciador y una nanopartícula. En algunas realizaciones del método, la aplicación del minicuerpo comprende administrar el minicuerpo a un sujeto. En algunas realizaciones del método, la

detección de la unión o ausencia de unión del minicuerpo de las mismas a CD8 comprende tomografía por emisión de positrones. En algunas realizaciones, el método comprende además aplicar un anticuerpo secundario o fragmento del mismo a la muestra, en donde el anticuerpo secundario o fragmento del mismo se une específicamente al minicuerpo. En algunas realizaciones del método, el minicuerpo se incuba con la muestra durante no más de 1 hora.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para dirigir un agente terapéutico a CD8. El método comprende administrar a un sujeto cualquiera de las realizaciones del minicuerpo proporcionado en la presente, en donde el minicuerpo se conjuga con un agente terapéutico.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para dirigir una célula linfocitaria T que expresa CD8 en un sujeto con necesidad de ello. El método comprende administrar al sujeto un minicuerpo de cualquiera de las realizaciones proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona un método para neutralizar una célula linfocitaria T que expresa CD8. En algunas realizaciones, el sujeto tiene por lo menos una de las siguientes células T CD8 anérgicas, células T CD8 disfuncionales, células T CD8 autorreactivas, células T CD8 hiperreactivas, células T CD8 inhibitorias, células T CD8 mal localizadas o linfoma de células T CD8. En algunas realizaciones, el sujeto tiene células T CD8 asociadas con por lo menos una de artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes, lupus eritematoso sistémico, afección autoinmune, inflamatoria, defecto de señalización o defecto coestimulador.

En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a CD8. El anticuerpo comprende una región bisagra, en donde la región bisagra comprende por lo menos uno de los siguientes: a) una secuencia peptídica de la SEQ ID NO: 1 ($X_{n1}CX_{n2}X_{n3}CX_{n4}X_{n5}C$), en donde X_{n1} puede ser cualquier aminoácido que no forme un enlace de reticulación covalente, en donde X_{n2} es uno de: A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, o V, en donde X_{n3} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n4} puede ser cualquier aminoácido, y en donde X_{n5} puede ser cualquier aminoácido; b) una secuencia peptídica de la SEQ ID NO: 2 ($X_{n1}X_{n2}X_{n3}X_{n4}X_{n5}X_{n6}CX_{n7}X_{n8}CX_{n9}X_{n10}C$), en donde X_{n1} puede ser cualquier aminoácido que no forme un enlace de reticulación covalente con otro aminoácido idéntico, en donde X_{n2} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n3} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n4} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n5} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n6} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n7} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n8} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n9} puede ser cualquier aminoácido, y en donde X_{n10} puede ser cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 208); c) una secuencia de bisagra central de por lo menos una de: CVECPCPC (SEQ ID NO: 57), CPCPCPC (SEQ ID NO: 52), o CPCPCPCPC (SEQ ID NO: 54), unida a una secuencia de bisagra superior de ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48); o d) una región bisagra superior que no comprende aminoácidos capaces de reticularse con un aminoácido correspondiente, y una región bisagra central conectada a un extremo C-terminal de la región bisagra superior, en donde la región bisagra central comprende por lo menos tres cisteínas. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un minicuerpo. En algunas realizaciones del anticuerpo, aparte de la región bisagra, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos humanizada. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende: una HCDR1 de la HCDR1 de la SEQ ID NO: 75; una HCDR2 de la HCDR2 de la SEQ ID NO: 76; una HCDR3 de la HCDR3 de la SEQ ID NO: 77; una LCDR1 de la LCDR1 de la SEQ ID NO: 78; una LCDR2 de la LCDR2 de la SEQ ID NO: 79; y una LCDR3 de la LCDR3 de la SEQ ID NO: 80.

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica la región bisagra de cualquiera de las realizaciones de anticuerpos descritas en la presente. En algunas realizaciones del ácido nucleico, aparte de la secuencia que codifica la región bisagra, el ácido nucleico comprende una secuencia humana. En algunas realizaciones, se proporciona una línea celular que expresa el anticuerpo codificado por el ácido nucleico.

En algunas realizaciones, se proporciona un método de fabricación del anticuerpo de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente, el método comprendiendo expresar el anticuerpo en una línea celular.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar una afección en un sujeto con necesidad de ello, el método comprendiendo administrar al sujeto el anticuerpo de cualquiera de las realizaciones proporcionadas en la presente.

5T4-IAB20M

La 5T4 es una glicoproteína oncofetal que tiene una expresión débil en tejidos adultos seleccionados, pero una fuerte expresión en varios tipos de carcinomas, incluyendo el cáncer colorrectal, renal, de mama, de ovario, gástrico, de pulmón y de próstata. La expresión de 5T4 se encuentra tanto en cánceres primarios como en metastásicos y el nivel de expresión se correlaciona con la progresión de la enfermedad, lo que convierte a la 5T4 en un biomarcador muy prometedor. Un ejemplo de proteína 5T4 se muestra con la SEQ ID NO: 133.

Un agente de imagenología específico de 5T4 puede proporcionar una ventaja significativa en especificidad sobre otros agentes de imagenología como FDG que se basan en la detección de cambios en el metabolismo. Además, los agentes de imagenología que se dirigen específicamente a 5T4 pueden ser una herramienta valiosa durante el desarrollo de terapias dirigidas a 5T4. Por ejemplo, el agente de imagenología puede usarse para monitorizar a los pacientes después del tratamiento de una terapia dirigida a la 5T4. En el caso del cáncer de próstata, en el mercado

hay un agente de imagenología SPECT aprobado por la FDA llamado Prostascint, pero tiene limitaciones considerables, ya que el anticuerpo intacto es murino (problema de inmunogenicidad con la administración repetida) y el epítipo es un epítipo interno del biomarcador PSMA (limita la precisión). Los presentes constructos de unión al antígeno 5T4 pueden tener ventajas significativas sobre el Prostascint en el sentido de que pueden unirse a un epítipo extracelular de 5T4, tienen una farmacocinética optimizada para la imagenología y están humanizados.

La proteína 5T4 también se conoce como glicoproteína de trofoblasto o TPBG. Los ejemplos de proteínas 5T4 son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la proteína 5T4 de la SEQ ID NO: 133.

Han estado en desarrollo anticuerpos terapéuticos y proteínas de fusión de anticuerpos contra la diana humana 5T4 incluyendo el anticuerpo murino "H8". Además, actualmente está en desarrollo clínico contra el antígeno de 5T4 una vacuna contra el cáncer llamada Trovax por Oxford Biomedica.

Un agente de imagenología específico de 5T4 puede proporcionar una ventaja significativa en especificidad sobre otros agentes de imagenología como FDG que se basan en la detección de cambios en el metabolismo. Además, los agentes de imagenología que se dirigen específicamente a 5T4 pueden ser una herramienta valiosa durante el desarrollo de terapias dirigidas a 5T4. Por ejemplo, el agente de imagenología puede usarse para monitorizar a los pacientes tras el tratamiento de una terapia dirigida a la 5T4. En el caso del cáncer de próstata, en el mercado hay un agente de imagenología SPECT aprobado por la FDA llamado Prostascint, pero tiene limitaciones considerables ya que el anticuerpo intacto es murino (problema de inmunogenicidad con la administración repetida) y el epítipo es un epítipo interno del biomarcador PSMA (limita la precisión). Los presentes constructos de unión a antígeno pueden tener ventajas significativas sobre el Prostascint en el sentido de que pueden unirse a un epítipo extracelular de 5T4, tienen una farmacocinética optimizada para la imagenología y están humanizados.

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno que se unen al antígeno 5T4 pueden ser anticuerpos, minicuerpos y/u otros fragmentos de anticuerpos como scFv. En las FIGS. 28B - 28E, 32, 36C, 54 (SEQ ID NO: 119 y 120), 55 (SEQ ID NO: 120), 56 (SEQ ID NO: 121), 57 (SEQ ID NO: 122), 58 (SEQ ID NO: 123), 59 (SEQ ID NO: 124), 67, 68 se muestran algunas realizaciones no limitativas de constructos de unión a antígeno contra 5T4.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno puede conectarse a un agente terapéutico para tratar una forma de cáncer, incluyendo, pero no limitado a: cáncer colorrectal, renal, de mama, de ovario, gástrico, de pulmón y/o de próstata.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno 5T4 puede usarse como agente terapéutico como constructo independiente (por ejemplo, sin una toxina conjugada al mismo). Aunque los fragmentos tienen una vida media más corta en comparación con el anticuerpo intacto, lo que sería menos óptimo para la terapia, estos formatos pueden mostrar una penetración tumoral mejorada basada en su tamaño más pequeño y ser terapéuticamente eficaces cuando se arman adecuadamente con un fármaco citotóxico o radioisótopo.

El 5T4 es un antígeno que se internaliza rápidamente, lo que puede hacerlo adecuado para enfoques de conjugados anticuerpo-fármaco. En algunas realizaciones, otro enfoque terapéutico es la radioinmunoterapia mediante la adición de un radiomarcador apropiado, como el emisor beta itrio-90, que puede provocar daño celular y la muerte del tejido canceroso local.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se usa para dirigirse a células que expresan el antígeno 5T4, incluyendo, por ejemplo, células de cáncer colorrectal, renal, de mama, de ovario, gástrico, de pulmón y/o de próstata.

La capacidad de obtener imágenes de todo el cuerpo de un paciente para detectar la presencia de la diana de un anticuerpo para y durante el tratamiento proporciona información valiosa para el tratamiento personalizado del paciente. Durante las pruebas de seguridad y eficacia de una terapia con anticuerpos, es útil poder seleccionar y probar el tratamiento en pacientes que expresan la diana del anticuerpo como parte de la progresión de su enfermedad.

La 5T4 se sobreexpresa en muchos carcinomas diferentes, incluyendo los colorrectales, renales, de mama, ováricos, gástricos, de pulmón y de próstata. Los agentes de imagenología como FDG-PET han demostrado ser bastante eficaces para la detección de muchos de estos tipos de cáncer, pero las prácticas de imagenología actuales no son lo suficientemente precisas para el cáncer de ovario y próstata. En algunas realizaciones, cualquiera de estos trastornos puede diagnosticarse y/o tratarse con varias constructos de 5T4 proporcionadas en la presente.

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno pueden ser agentes de imagenología clínica (PET/SPECT) en humanos. Como 5T4 se sobreexpresa en múltiples tipos de cáncer (incluyendo colorrectal, renal, mama, ovario, gástrico, pulmón y próstata), estos constructos de unión a antígeno 5T4 pueden usarse para la detección diagnóstica dirigida de estos cánceres. En algunas realizaciones, esto puede usarse para la detección del cáncer de ovario y/o próstata.

El término "trastorno dependiente de 5T4" incluye cualquier trastorno en el que 5T4 desempeña una función en el propio trastorno. En algunas realizaciones, esto denota sobreexpresión de 5T4. Ejemplos de trastornos incluyen, múltiples tipos de cáncer, como cáncer colorrectal, renal, de mama, de ovario, gástrico, de pulmón y de próstata, por ejemplo.

En algunas realizaciones, se proporciona un minicuerpo que se une a 5T4. El minicuerpo comprende un polipéptido que comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que se une a 5T4, el scFv comprendiendo un dominio variable pesado (V_H) enlazado a un dominio variable ligero (V_L); y una región bisagra variante que comprende por lo menos tres cisteínas en cada cadena de la bisagra. En algunas realizaciones, el minicuerpo comprende además una secuencia C_{H3} de IgG humana. En algunas realizaciones, el minicuerpo comprende además un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en una sustancia radiactiva, un colorante, un agente de contraste, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, una enzima, un agente potenciador y una nanopartícula.

En algunas realizaciones, el minicuerpo proporcionado en la presente comprende: una HCDR1 de la HCDR1 en la SEQ ID NO: 87; una HCDR2 de la HCDR2 en la SEQ ID NO: 88; una HCDR3 de la HCDR3 en SEQ ID NO: 89; una LCDR1 de la LCDR1 en la SEQ ID NO: 90; una LCDR2 de la LCDR2 en la SEQ ID NO: 91; y una LCDR3 de la LCDR3 en la SEQ ID NO: 92. En algunas realizaciones, el minicuerpo proporcionado en la presente comprende: un dominio variable pesado (V_H) y un dominio variable ligero (V_L). En algunas realizaciones del minicuerpo proporcionado en la presente, el dominio variable pesado (V_H) y el dominio variable ligero (V_L) son secuencias humanas.

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona una línea celular que produce cualquiera de las realizaciones de minicuerpos descritas en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona un kit que comprende cualquiera de las realizaciones del minicuerpo descritas en la presente y un marcador detectable.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de 5T4. El método comprendiendo: aplicar cualquiera de las realizaciones de minicuerpos proporcionadas en la presente a una muestra; y detectar una unión o una ausencia de unión del constructo de unión a antígeno de las mismas a 5T4. En algunas realizaciones del método, el minicuerpo comprende un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en una sustancia radiactiva, un colorante, un agente de contraste, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, una enzima, un agente potenciador y una nanopartícula. En algunas realizaciones del método, la aplicación del minicuerpo comprende la administración del minicuerpo a un sujeto. En algunas realizaciones del método, la detección de la unión o ausencia de unión del minicuerpo a un antígeno diana comprende tomografía por emisión de positrones. En algunas realizaciones, el método comprende además aplicar un anticuerpo secundario o fragmento del mismo a la muestra, en donde el anticuerpo secundario o fragmento del mismo se une específicamente al minicuerpo. En algunas realizaciones del método, el minicuerpo se incuba con la muestra durante no más de 1 hora.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para dirigir un agente terapéutico a 5T4. El método comprende administrar a un sujeto cualquiera de las realizaciones del minicuerpo proporcionado en la presente, en donde el minicuerpo se conjuga con un agente terapéutico.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para dirigir 5T4 en un sujeto con necesidad de ello. El método comprende administrar al sujeto un minicuerpo de cualquiera de las realizaciones proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones del método, el sujeto tiene por lo menos uno de tumor o cáncer colorrectal, renal, de mama, de ovario, gástrico, de pulmón o de próstata. En algunas realizaciones, el sujeto tiene por lo menos uno de cáncer primario o cáncer metastásico. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un trastorno en estadio temprano. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un trastorno en estadio intermedio. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un trastorno en estadio tardío.

En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a 5T4. El anticuerpo comprende una región bisagra, en donde la región bisagra comprende por lo menos uno de los siguientes: a) una secuencia peptídica de la SEQ ID NO: 1 ($X_{n1}CX_{n2}X_{n3}CX_{n4}X_{n5}C$), en donde X_{n1} puede ser cualquier aminoácido que no forma un enlace de reticulación covalente, en donde X_{n2} es uno de: A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, o V, en donde X_{n3} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n4} puede ser cualquier aminoácido, y en donde X_{n5} puede ser cualquier aminoácido; b) una secuencia peptídica de la SEQ ID NO: 2 ($X_{n1}X_{n2}X_{n3}X_{n4}X_{n5}X_{n6}CX_{n7}X_{n8}CX_{n9}X_{n10}C$), en donde X_{n1} puede ser cualquier aminoácido que no forme un enlace de reticulación covalente con otro aminoácido idéntico, en donde X_{n2} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n3} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n4} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n5} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n6} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n7} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n8} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n9} puede ser cualquier aminoácido, y en donde X_{n10} puede ser cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 208); c) una secuencia de bisagra central de por lo menos una de: CVECPPCP (SEQ ID NO: 57), CPPCPPC (SEQ ID NO: 52), o CPPCPPCPPC (SEQ ID NO: 54), unida a una secuencia de bisagra superior de ELKTPGLGDTTHT (SEQ ID NO: 48); o d) una región bisagra superior que no comprende aminoácidos capaces de reticularse con un aminoácido correspondiente, y una región bisagra central conectada a un extremo C-terminal de la región bisagra superior, en donde la región bisagra central

comprende por lo menos tres cysteínas. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un minicuerpo. En algunas realizaciones del anticuerpo, aparte de la región bisagra, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos humanizada.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende: una HCDR1 de la HCDR1 en la SEQ ID NO: 87; una HCDR2 de la HCDR2 en la SEQ ID NO: 88; una HCDR3 de la HCDR3 en SEQID NO: 89; una LCDR1 de la LCDR1 en la SEQ ID NO: 90; una LCDR2 de la LCDR2 en la SEQ ID NO: 91; y una LCDR3 de la LCDR3 en la SEQ ID NO: 92.

10 En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica la región bisagra de cualquiera de las realizaciones de anticuerpos descritas en la presente. En algunas realizaciones del ácido nucleico, aparte de la secuencia que codifica la región bisagra, el ácido nucleico comprende una secuencia humana. En algunas realizaciones, se proporciona una línea celular que expresa el anticuerpo codificado por el ácido nucleico.

15 En algunas realizaciones, se proporciona un método de fabricación del anticuerpo de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente. El método comprende expresar el anticuerpo en una línea celular.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar una afección en un sujeto con necesidad de ello, el método comprende administrar al sujeto el anticuerpo de cualquiera de las realizaciones proporcionadas en la presente.

20

CD3-IAB25M

25 El CD3 (cúmulo de diferenciación 3) fue descubierto a la vez que el anticuerpo monoclonal OKT3. Inicialmente, se descubrió que OKT3 se unía a todas las células T periféricas maduras, y más tarde se determinó que la subunidad CD3 épsilon como parte del complejo TCR-CD3 era el antígeno de superficie celular al que se unía OKT3. (Kung, P. et al., "Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens," Science, Vol. 206, N° 4416, págs. 347-349, 1979). Con las SEQ ID NO: 136-139 se muestran ejemplos de subunidades CD3. El OKT3 se probó posteriormente como inmunosupresor para el rechazo de trasplantes con el ensayo inicial que estudiaba el rechazo agudo de aloinjertos renales (Cosimi, A. B. et al., "Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody," Transplantation, Vol. 32, N° 6, págs. 535-539, 1981).

30

En algunas realizaciones, se proporcionan constructos de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, como minicuerpos, que se unen a una molécula diana, CD3. Tales constructos de unión a antígeno pueden ser útiles para detectar la presencia, localización y/o cantidades de la molécula diana (CD3 y/o células CD3+). Tales constructos de unión a antígeno también pueden ser útiles para modular la actividad biológica asociada con la expresión de CD3 en células inmunitarias y para dirigir agentes terapéuticos a células que expresan la proteína de CD3. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para detectar la presencia o ausencia de la molécula diana (o "diana") usando constructos de unión a antígeno (incluyendo anticuerpos y constructos como minicuerpos).

35 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para usar los constructos de unión a antígeno con propósitos terapéuticos.

40

Algunas realizaciones de los minicuerpos de CD3 divulgados en la presente también pueden usarse como minicuerpos terapéuticos, por ejemplo para modular la reacción del sistema inmunitario neutralizando células T a través del dominio épsilon CD3 del complejo TCR y regulando por incremento las células reguladoras T a través de la regulación por incremento de FOXP3 (Saruta, M. et al., "Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease," Clin. Immunol., Vol. 125, N° 3, págs. 281-290, 2007). Tales agentes terapéuticos son útiles para tratar no sólo los trasplantes de aloinjertos de tejidos y órganos, sino también enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la diabetes de tipo 1 y el lupus eritematoso, por citar algunas.

45

Se ha realizado una prueba de concepto inicial de imagenología preclínica con un anticuerpo humanizado anti-CD3, Visilizumab, que no se derivó de OKT3 (Malviya, G. et al., "Radiolabeled humanized anti-CD3 monoclonal antibody Visilizumab for imaging human T-lymphocytes," Vol. 50, N° 10, págs. 1683-1691, 2009). La imagenología de células T CD3+ es útil para la terapia anti-CD3, ya que el tratamiento es eficaz si el órgano de interés se ha infiltrado por completo con células T CD3+. Un potencial agente de imagenología CD3 permitiría la selección del paciente y también una forma de monitorizar el tratamiento. La imagenología con un anticuerpo de longitud completa requiere típicamente un tiempo posterior a la inyección más prolongado para una imagenología óptima que con los fragmentos proporcionados en la presente.

55

En algunas realizaciones se proporcionan constructos de unión a antígeno anti-CD3, como minicuerpos. Los constructos de unión a antígeno pueden usarse, por ejemplo, para la imagenología y para el tratamiento de varios trastornos que afectan al sistema inmunitario.

60

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno que se unen al antígeno CD3 pueden ser anticuerpos, minicuerpos y/u otros fragmentos de anticuerpos como scFv. En las FIGS. 33, 36D, 69 se muestran

65

algunas realizaciones no limitativas de constructos de unión a antígeno contra CD3.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno puede usarse como agente terapéutico sin enlace a otra molécula como una toxina (véase, por ejemplo, Chatenoud, L. et al., "CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity," Nat. Rev. Immunol., Vol. 7, N° 8, págs. 622-632, 2007). Tales constructos de unión a antígeno también pueden ser útiles para modular la actividad biológica asociada con la expresión de CD3 en células inmunitarias para tratar una variedad de enfermedades, incluyendo cáncer, diabetes y afecciones autoinmunes e inflamatorias. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno solo puede usarse como inmunosupresor y muestra actividad para inhibir la señalización de CD3.

Los constructos de unión a antígeno CD3 divulgados en la presente también pueden usarse como constructo terapéutico de unión a antígeno, por ejemplo para modular la reacción del sistema inmunitario neutralizando las células T a través del dominio épsilon CD3 del complejo TCR y regulando por incremento las células reguladoras T a través de la regulación por incremento de FOXP3 (Saruta, M. et al., 2007). Tales agentes terapéuticos son útiles para tratar no sólo los trasplantes de aloinjertos de tejidos y órganos, sino también enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la diabetes de tipo 1 y el lupus eritematoso, por citar algunas.

En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno, como un minicuerpo, puede contener una o más CDR de las regiones variables pesada o ligera de Teplizumab.

En algunas realizaciones, uno o más de los constructos de unión a antígeno proporcionados en la presente pueden combinarse con otros agentes de direccionamiento de células inmunitarias, como anticuerpos dirigidos a OX40, CD134, CD40, CD154, CD80, CD86, ICOS, CD137 y/o antagonistas del receptor de IL-1. En algunas realizaciones, el minicuerpo dirigido a CD3 disminuye una respuesta inmunitaria y no es necesario conjugar ningún agente terapéutico adicional con el constructo de unión a antígeno. Por tanto, en algunas realizaciones, se proporcionan minicuerpos para el tratamiento de la diabetes autoinmune u otras afecciones autoinmunes que implican células T que no se conjugan o no implican un agente terapéutico.

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno CD3 pueden usarse como constructo terapéutico de unión a antígeno para modular la reacción del sistema inmunitario estimulando y tolerando células T a través del dominio épsilon CD3 del complejo TCR y/o regulando por incremento las células reguladoras T a través de la regulación por incremento de FOXP3 (Saruta, M. et al., 2007), (Saruta, M. et al., 2007). Tales agentes terapéuticos pueden ser útiles en el tratamiento no sólo de los trasplantes de aloinjertos de tejidos y órganos, sino también de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la diabetes de tipo 1, el lupus eritematoso, etc.

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno puede usarse como agente terapéutico sin enlace a otra molécula como una toxina (véase, por ejemplo, Chatenoud, L. et al., 2007). Tales constructos de unión a antígeno también pueden ser útiles para modular la actividad biológica asociada con la expresión de CD3 en células inmunitarias para tratar una variedad de enfermedades que incluyen cáncer, diabetes y afecciones autoinmunes e inflamatorias. En algunas realizaciones, puede usarse el constructo de unión a antígeno por sí solo como inmunosupresor y muestra actividad para inhibir la señalización de CD3.

Sin estar limitados por ninguna teoría, en algunas realizaciones, un constructo biespecífico de unión a antígeno se une a la diana en la célula positiva a la diana, y se une al primer antígeno (que puede ser diferente de CD3) en la primera célula, y por lo tanto lleva a la célula positiva a la diana a la proximidad de la primera célula. Por ejemplo, una célula CD3+ puede acercarse a una célula cancerosa y facilitar una respuesta inmunitaria contra esa célula cancerosa.

En algunas realizaciones, el minicuerpo puede conjugarse con un agente terapéutico para el tratamiento del trastorno dependiente de CD3.

El sujeto puede padecer cualquiera de una serie de trastornos dependientes de CD3, que, por ejemplo, pueden ser Artritis Reumatoide, Esclerosis Múltiple, Diabetes Tipo 1 o Lupus Eritematoso.

En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno tal como se proporciona en la presente permite una disminución significativa de los efectos secundarios indeseables, incluyendo, pero no limitado a, la liberación de citoquinas proinflamatorias, la activación de células T, y/o la proliferación celular.

En algunas realizaciones, se proporciona un método de tratamiento por el que el sujeto puede beneficiarse de la aplicación de constructos de unión a antígeno dirigidos a CD3, pero en lugar de un constructo de longitud completa, se administra en su lugar un minicuerpo, para dar como resultado una menor estimulación de la activación de las células inmunitarias después de la unión del constructo de unión a antígeno a CD3 *in vivo*.

En algunas realizaciones, la cantidad del minicuerpo en una composición farmacéutica es mayor que la

cantidad que de otro modo podría administrarse para un constructo de longitud completa (por ejemplo, OKT3 de longitud completa). En algunas realizaciones, la cantidad administrada induciría una tormenta de citoquinas en el sujeto, si se hubiese administrado la cantidad como un constructo de longitud completa. En algunas realizaciones, la cantidad que puede administrarse sin provocar una tormenta de citoquinas o el síndrome de liberación de citoquinas (CRS), es de por lo menos 10 microgramos/m², por ejemplo, pueden administrarse por lo menos 10, 17, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o por lo menos 1000 microgramos/m² del formato minicuerpo. En algunas realizaciones, esta cantidad no dará como resultado el síndrome de liberación de citoquinas. En algunas realizaciones, esta cantidad no dará como resultado un síndrome de liberación de citoquinas de Grado 1 y/o Grado 2. En algunas realizaciones, esta cantidad no dará como resultado uno o más de los siguientes síntomas: erupción cutánea, dolor de cabeza, náuseas, vómitos y/o escalofríos/rigores/pirexia. En algunas realizaciones, estos síntomas, que normalmente se producirían el Día 1 o el Día 5 o 6 de la dosificación si se usase un anticuerpo de longitud completa, no estarán presentes si se emplea un minicuerpo.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para el tratamiento de un individuo que necesita una terapia de bloqueo de CD3, y en donde el individuo también está en riesgo de desarrollar y/o experimentar una tormenta de citoquinas. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto en riesgo de experimentar una tormenta de citoquinas un constructo de minicuerpo de un anticuerpo de longitud completa; sin embargo, el formato minicuerpo permitirá una reducción de la intensidad de cualquier activación de células inmunitarias que se produciría de otro modo, si se hubiera administrado al sujeto un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el minicuerpo puede compartir las mismas CDR (o CDR similares) y/o las mismas regiones variables de cadena pesada y ligera (o regiones variables de cadena pesada y ligera similares). En algunas realizaciones, la administración del minicuerpo permite una menor estimulación de la activación de las células inmunitarias después de que se produzca la unión a CD3. En algunas realizaciones, la administración del minicuerpo permite una reducción del nivel de citoquinas liberadas después de que se produzca la unión a CD3. En algunas realizaciones, la administración del minicuerpo permite que se produzcan cantidades menores de activación después de la unión a CD3 que si se hubiese empleado un constructo de longitud completa.

En algunas realizaciones, puede administrarse una terapia CD3 sin tener que administrar una contra terapia, en donde la contra terapia estaría diseñada para reducir o bloquear una tormenta de citoquinas. En algunas realizaciones, esto comprende administrar un constructo de unión a antígeno de minicuerpo al sujeto, en lugar de un constructo de longitud completa.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para reducir una intensidad y/o probabilidad de una tormenta de citoquinas, el método puede incluir identificar a un sujeto que va a recibir un constructo de unión a antígeno que se va a unir a CD3, y administrar al sujeto una cantidad eficaz de un minicuerpo que se une a CD3. En algunas realizaciones, el constructo es uno o más de los proporcionados en la presente.

Como se describe en la presente, la capacidad de reducir y/o evitar una tormenta de citoquinas (u otro aspecto, como la reducción de la activación y/o proliferación) puede ser especialmente relevante para los constructos de unión a antígeno que se unen a CD3. En algunas realizaciones, puede emplearse el proceso (por ejemplo, usando un formato de minicuerpo) para evitar tales problemas para otras proteínas diana, por ejemplo, cualquier proteína diana para la que la unión de un anticuerpo a la diana provoque una tormenta o activación/proliferación de citoquinas. En algunas realizaciones, el método puede emplearse para permitir evitar una activación inapropiada y/o perjudicial en un sujeto, en la que la activación se produce en respuesta a una proteína de unión a antígeno bivalente. En algunas realizaciones, en lugar de una proteína de unión a antígeno CD3, puede emplearse una proteína de unión a antígeno CD28 (por ejemplo, minicuerpo) que se une a CD28).

En algunas realizaciones, el uso de un minicuerpo contra CD3 permite que un sujeto reciba niveles adecuados del constructo de unión a antígeno para permitir el tratamiento de un trastorno dependiente de CD3. En algunas realizaciones, el sujeto puede recibir las moléculas de unión a CD3 sin tener que recibir también y/o posteriormente inyecciones de insulina. En algunas realizaciones, el uso de un constructo de minicuerpo contra CD3 permite amortiguar una respuesta impulsada por CD3 sin destruir demasiadas células B en el proceso. En algunas realizaciones, la activación/proliferación que se reduce incluye la activación y/o proliferación de una célula T y/o una célula asesina natural (NK).

En algunas realizaciones, proporcionar un constructo de unión a antígeno a un sujeto que lo necesita comprende proporcionar una cantidad eficaz de un constructo de unión a antígeno a CD3, en donde dicho constructo de unión a antígeno se une a CD3, pero no da como resultado un aumento significativo en una cantidad de por lo menos uno de liberación, activación o proliferación de citoquinas.

En algunas realizaciones, se proporciona un método de administración de un agente terapéutico que se une a CD3 en una célula inmunitaria. El método comprende proporcionar un constructo de unión a antígeno como se proporciona en la presente (por ejemplo, cualquiera de los minicuerpos para CD3) a un sujeto que necesita reducir una cantidad de CD3. El constructo de unión a antígeno se une a CD3; sin embargo, como se muestra por los datos proporcionados en la presente, el constructo de unión a antígeno no da como resultado una cantidad significativa de

un aumento en por lo menos uno de liberación, activación o proliferación de citoquinas. En algunas realizaciones, la disminución de CD3 denota una disminución de la cantidad de proteína de CD3 libre disponible. En algunas realizaciones, la disminución de CD3 denota la disminución de células que expresan la proteína de CD3.

5 En algunas realizaciones, el constructo no da como resultado una tormenta de citoquinas a un nivel que sería inaceptablemente perjudicial para el sujeto.

10 En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno dependiente de CD3. El método comprende proporcionar al sujeto una cantidad eficaz de un constructo de unión a antígeno. El constructo de unión a antígeno es un minicuerpo que se une a CD3. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno está conjugado con un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno comprende una disposición bivalente que comprende un primer sitio de unión y un segundo sitio de unión, en donde el primer sitio de unión se une a CD3, y en donde el segundo sitio de unión se une a CD3. La cantidad eficaz es una cantidad molar que, si el constructo de unión a antígeno se hubiese administrado en un formato diferente, en particular en el formato de anticuerpo completo (por ejemplo OKT3), la cantidad molar induciría una tormenta de citoquinas a una intensidad que la haría inaceptable para propósitos terapéuticos. Sin embargo, esta misma cantidad molar, cuando el constructo de unión a antígeno es un minicuerpo, sigue siendo eficaz para la terapia basada en CD3, pero no induce una tormenta de citoquinas a niveles inaceptables.

20 En algunas realizaciones, como los presentes constructos pueden usarse para terapias, aunque sean bivalentes y se unan a CD3, pueden emplearse constructos terapéuticos de constructos de unión a antígeno CD3. En algunas realizaciones, se proporciona un constructo de unión a antígeno que se une a CD3 *in vivo*, pero no da como resultado una cantidad significativa de por lo menos uno de liberación, activación o proliferación de citoquinas.

25 El término "trastorno dependiente de CD3" incluye la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la diabetes de tipo 1, el lupus eritematoso, la enfermedad inflamatoria intestinal, la diabetes, el rechazo de trasplantes de órganos, las enfermedades autoinmunes, las alergias y otros trastornos en los que las células T y/o asesinas naturales (NK) desempeñan una función en la patología.

30 Una "tormenta de citoquinas", también conocida como "cascada de citoquinas" o "hipercitoquinemia", es una reacción inmunitaria potencialmente mortal que implica un bucle de retroalimentación positiva entre las citoquinas y las células inmunitarias, con niveles muy elevados de varias citoquinas. Los síntomas de una tormenta de citoquinas son fiebre alta, hinchazón y enrojecimiento, fatiga extrema y náuseas. En algunos casos, la reacción inmunitaria puede ser mortal. Típicamente, es aceptable y necesario cierto nivel de liberación de citoquinas, por ejemplo, cuando se lucha contra una infección. Cuando se tienen escalofríos febriles asociados a la gripe, tales síntomas son el resultado de la lucha del sistema inmunitario contra el virus, por lo que tales niveles son aceptables y no constituyen una "tormenta de citoquinas". Sin embargo, cuando el brazo de activación se sobreestimula y no se equilibra con una señal inhibidora, estas citoquinas pueden provocar daños en órganos y tejidos y, en última instancia, la muerte. En algunas realizaciones, los constructos proporcionados en la presente pueden ser útiles para evitar y/o minimizar el síndrome de liberación de citoquinas y, por lo tanto, pueden aplicarse a situaciones en las que, de otro modo, podrían usarse anticuerpos anticélulas T de longitud completa. En algunas realizaciones, también puede aplicarse al síndrome de liberación de citoquinas cualquiera de los métodos proporcionados en la presente dirigidos a las tormentas de citoquinas.

45 En algunas realizaciones, el sujeto tiene una enfermedad inflamatoria y/o autoinmune. En algunas realizaciones, la afección se selecciona entre por lo menos una de artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1 o lupus eritematoso.

50 En algunas realizaciones, las citoquinas son aquellas que están implicadas en las tormentas de citoquinas inducidas por la administración del anticuerpo OKT3 de longitud completa. En algunas realizaciones, las citoquinas incluyen por lo menos una de IFN γ , IL-2, TNF- α , o IL-17.

55 En algunas realizaciones, se proporciona un minicuerpo que se une a CD3. El minicuerpo comprende un polipéptido que comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que se une a CD3, el scFv comprende un dominio variable pesado (V_H) enlazado a un dominio variable ligero (V_L); y una región bisagra variante que comprende por lo menos tres cisteínas en cada cadena de la bisagra. En algunas realizaciones, el minicuerpo comprende además una secuencia CH_3 de IgG humana. En algunas realizaciones, el minicuerpo comprende además un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en una sustancia radiactiva, un colorante, un agente de contraste, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, una enzima, un agente potenciador y una nanopartícula.

60 En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona una línea celular que produce cualquiera de las realizaciones de minicuerpos descritas en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona un kit que comprende cualquiera de las realizaciones del minicuerpo descritas en la presente y un marcador detectable.

65

En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de CD3. El método comprende: aplicar cualquiera de las realizaciones de minicuerpos proporcionadas en la presente a una muestra; y detectar una unión o una ausencia de unión del constructo de unión a antígeno de las mismas a CD3. En algunas realizaciones del método, el minicuerpo comprende un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en una sustancia radiactiva, un colorante, un agente de contraste, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, una enzima, un agente potenciador y una nanopartícula. En algunas realizaciones del método, la aplicación del minicuerpo comprende la administración del minicuerpo a un sujeto. En algunas realizaciones del método, la detección de la unión o ausencia de unión del minicuerpo al antígeno diana comprende tomografía por emisión de positrones. En algunas realizaciones, el método comprende además aplicar un anticuerpo secundario o fragmento del mismo a la muestra, en donde el anticuerpo secundario o fragmento del mismo se une específicamente al minicuerpo. En algunas realizaciones del método, el minicuerpo se incuba con la muestra durante no más de 1 hora.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para dirigir un agente terapéutico a CD3. El método comprende administrar a un sujeto cualquiera de las realizaciones del minicuerpo proporcionadas en la presente, en donde el minicuerpo se conjuga con un agente terapéutico.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para dirigir una célula linfocitaria T que expresa CD3 en un sujeto con necesidad de ello. El método comprende administrar al sujeto un minicuerpo de cualquiera de las realizaciones proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona un método para neutralizar una célula linfocitaria T que expresa CD3. En algunas realizaciones, el sujeto tiene por lo menos una de las siguientes células T CD3 anérgicas, células T CD3 disfuncionales, células T CD3 autorreactivas, células T CD3 hiperreactivas, células T CD3 inhibitorias, células T CD3 mal localizadas o linfoma de células T CD3. En algunas realizaciones, el sujeto tiene células T CD3 asociadas con por lo menos una de artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes, lupus eritematoso sistémico, afección autoinmune, inflamatoria, defecto de señalización o defecto coestimulador.

En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a CD3. El anticuerpo comprende una región bisagra, en donde la región bisagra comprende por lo menos uno de los siguientes: a) una secuencia peptídica de la SEQ ID NO: 1 ($X_{n1}CX_{n2}X_{n3}CX_{n4}X_{n5}C$), en donde X_{n1} puede ser cualquier aminoácido que no forma un enlace de reticulación covalente, en donde X_{n2} es uno de: A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, o V, en donde X_{n3} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n4} puede ser cualquier aminoácido, y en donde X_{n5} puede ser cualquier aminoácido; b) una secuencia peptídica de la SEQ ID NO: 2 ($X_{n1}X_{n2}X_{n3}X_{n4}X_{n5}X_{n6}CX_{n7}X_{n8}CX_{n9}X_{n10}C$), en donde X_{n1} puede ser cualquier aminoácido que no forme un enlace de reticulación covalente con otro aminoácido idéntico, en donde X_{n2} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n3} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n4} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n5} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n6} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n7} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n8} puede ser cualquier aminoácido, en donde X_{n9} puede ser cualquier aminoácido, y en donde X_{n10} puede ser cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 208); c) una secuencia de bisagra central de por lo menos una de: CVECPPCP (SEQ ID NO: 57), CPPCPPC (SEQ ID NO: 52), o CPPCPPPPC (SEQ ID NO: 54), unida a una secuencia de bisagra superior de ELKTPGLGDTTHT (SEQ ID NO: 48); o d) una región bisagra superior que no comprende aminoácidos capaces de reticularse con un aminoácido correspondiente, y una región bisagra central conectada a un extremo C-terminal de la región bisagra superior, en donde la región bisagra central comprende por lo menos tres cisteínas. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un minicuerpo. En algunas realizaciones del anticuerpo, aparte de la región bisagra, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos humanizada.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende: una HCDR1 en la HCDR1 de la SEQ ID NO: 174 de la Tabla 8; una HCDR2 de la HCDR2 en la SEQ ID NO: 175 de la Tabla 8; una HCDR3 de la HCDR3 en la SEQ ID NO: 176 de la Tabla 8; una LCDR1 de la LCDR1 en la SEQ ID NO: 177 de la Tabla 8; una LCDR2 de la LCDR2 en la SEQ ID NO: 97 de la Tabla 8; y una LCDR3 de la LCDR3 en la SEQ ID NO: 178 de la Tabla 8 para CD3.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende: una HCDR1 de la HCDR1 en las FIGS. 65B o 65C; una HCDR2 de la HCDR2 de las FIGS. 65B o 65C; una HCDR3 de la HCDR3 en las FIGS. 65B o 65C; una LCDR1 de la LCDR1 en las FIGS. 65B o 65C; una LCDR2 de la LCDR2 en las FIGS. 65B o 65C; y una LCDR3 de la LCDR3 en las FIGS. 65B o 65C.

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno que se unen al antígeno CD3 pueden ser anticuerpos, minicuerpos y/u otros fragmentos de anticuerpos como scFv. En las FIGS. 65B y 65C se muestran algunas realizaciones no limitativas de constructos de unión a antígeno contra CD3.

En algunas realizaciones, el minicuerpo comprende: una HCDR1 de la HCDR1 en las FIGS. 65B o 65C; una HCDR2 de la HCDR2 en las FIGS. 65B o 65C; una HCDR3 de la HCDR3 en las FIGS. 65B o 65C; una LCDR1 de la LCDR1 en las FIGS. 65B o 65C; una LCDR2 de la LCDR2 en las FIGS. 65B o 65C; y una LCDR3 de la LCDR3 en las FIGS. 65B o 65C. En algunas realizaciones del minicuerpo proporcionado en la presente, el dominio variable pesado (V_H) y el dominio variable ligero (V_L) son secuencias humanas.

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica la región bisagra de cualquiera de

las realizaciones de anticuerpos descritas en la presente. En algunas realizaciones del ácido nucleico, aparte de la secuencia que codifica la región bisagra, el ácido nucleico comprende una secuencia humana. En algunas realizaciones, se proporciona una línea celular que expresa el anticuerpo codificado por el ácido nucleico.

5 En algunas realizaciones, se proporciona un método para fabricar el anticuerpo de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente. El método comprende expresar el anticuerpo en una línea celular.

10 En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar una afección en un sujeto con necesidad de ello, el método comprendiendo administrar al sujeto el anticuerpo de cualquiera de las realizaciones proporcionadas en la presente.

Realizaciones adicionales

15 En algunas realizaciones, el scFv o el minicuerpo tienen propiedades farmacocinéticas superiores para la imagenología de diagnóstico. La tecnología actual utiliza imagenología con el anticuerpo intacto que requiere un tiempo significativamente más largo (~7 días después de la inyección en) para producir imágenes de alto contraste debido a la lenta depuración del suero de los anticuerpos de longitud completa. El minicuerpo ofrece la posibilidad de imagenología en el mismo día o al día siguiente. Cada día es vital para los pacientes con una enfermedad de progresión agresiva, y la capacidad de identificar el enfoque terapéutico adecuado en un momento más temprano
20 tiene el potencial de mejorar la supervivencia del paciente. La imagenología en el mismo día o al día siguiente también proporciona una solución logística al problema al que se enfrentan muchos pacientes que viajan grandes distancias para recibir tratamiento/diagnóstico, ya que la duración de las estancias de viaje o la necesidad de volver una semana más tarde se eliminarían al realizar la imagenología con minicuerpos frente a anticuerpos de longitud completa. En algunas realizaciones, la exposición a dosis más bajas de radiación permite obtener imágenes varias veces y seguir la progresión de la enfermedad a lo largo del tiempo.

Adicionalmente, en algunas realizaciones, los monómeros componentes del minicuerpo contienen residuos de cisteína bisagra que forman enlaces disulfuro. Estos residuos de cisteína unidos covalentemente pueden abrirse mediante una reducción química suave para proporcionar un grupo tiol activo para la conjugación específica de cisteína mientras se mantiene la integridad de la molécula de minicuerpo dimérica. Los métodos actuales de conjugación química incluyen las siguientes plataformas específicas de sitio: Introducción de una cisteína en la región F(ab)'2 del anticuerpo, por ejemplo Thio-Mabs (Roche); una cisteína en la posición de 239 en el Fc (DISH-Mab, Seattle Genetics), aminoácidos no naturales, como la ceto-fenilalanina (Ambrx) para la formación de conectores de enlaces de alcóxiamina, fenilalaninaazidometano (Sutro) para la cicloadición de clic, glutamina en la región Fc para la conjugación dependiente de transglutaminasa (Rinat-Pfizer). Las cisteínas bisagra de los mAbs proporcionan un asa química para la química de conjugación tiol no específica de sitio. La conjugación con lisinas también es inespecífica o aleatoria y da como resultado la heterogeneidad más alta. En algunas realizaciones, puede introducirse una cisteína específica del sitio en el scFv, el marco u otra porción del constructo de unión a antígeno proporcionado en la presente.

40 La capacidad de obtener imágenes de todo el cuerpo de un paciente para detectar la presencia de la diana de un anticuerpo antes y durante el tratamiento proporciona información valiosa para el tratamiento personalizado del paciente. Durante las pruebas de seguridad y eficacia de una terapia de anticuerpos, es útil poder seleccionar y probar el tratamiento en pacientes que expresan la diana del anticuerpo como parte de la progresión de su enfermedad.

45 En algunas realizaciones, los fragmentos de diagnóstico de scFv o minicuerpo que coinciden con las terapias de anticuerpos disponibles permiten emparejar el estado de la enfermedad del paciente con la terapia de anticuerpos apropiada.

50 En algunas realizaciones, se proporciona un método para dirigir un primer antígeno en una célula positiva para la molécula diana. El método puede incluir aplicar un constructo de unión a antígeno biespecífico a una muestra. El constructo de unión a antígeno biespecífico puede incluir un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente. El anticuerpo biespecífico o fragmento del mismo puede incluir un constructo de unión a antígeno que se une al primer antígeno, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, o 6 CDR, un scFv, o un monómero de un minicuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico incluye 1, 2 o 3 HCDR de un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente, y/o 1, 2 o 3 LCDR de un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno biespecífico incluye un scFv de un constructo de unión a antígeno como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno biespecífico incluye una secuencia V_H o V_L como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno biespecífico incluye un monómero de minicuerpo como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno biespecífico se aplica a una muestra *in vivo*, por ejemplo un órgano o tejido de un sujeto. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno biespecífico se aplica a una muestra *in vitro*. Sin limitarse a ninguna teoría, en algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno biespecífico se une a la diana en la célula diana positiva, y se une al primer antígeno (que puede ser diferente de la primera molécula diana) en la primera célula, y por lo tanto pone la célula diana positiva en proximidad a la primera célula. Por ejemplo, puede acercarse una primera célula positiva para la molécula diana a una célula cancerosa y facilitar una respuesta

inmunitaria contra esa célula cancerosa. En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno biespecífico compuesto por una primera molécula diana y un segundo fragmento de molécula diana puede acercar una célula T citotóxica a una célula inmunitaria que exprese la primera molécula diana activada o a una célula tumoral que exprese la primera molécula diana para provocar la destrucción de la célula diana. En algunas realizaciones, puede dirigirse a cualquier célula inmunitaria (célula NK o B o célula dendrítica) y llevarla a una célula que exprese antígeno, según se determine por la especificidad del segundo scFv.

Los constructos de minicuerpos contienen scFv de unión a antígeno con longitudes de conector variables que pueden estar en orientación V_L-V_H o V_H-V_L . Los scFv pueden enlazarse a cualquiera de las 12 secuencias de bisagra descritas en la Tabla 0.1. Los scFv y las bisagras apropiadas pueden enlazarse con dominios C_H3 de anticuerpos de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas realizaciones, la primera cisteína de bisagra que se empareja habitualmente con la cadena ligera en anticuerpos de IgG1, IgG2 e IgG3 nativos debe mutarse a una serina o alanina u otro aminoácido apropiado para evitar el reordenamiento y/o la concatamerización de disulfuros. Para reducir la presencia o reducir la formación de medias moléculas y mejorar la estabilidad *in vivo*, la región bisagra debe contener por lo menos tres cisteínas para formar por lo menos tres enlaces disulfuro con el otro monómero. Tres cisteínas por cadena en la bisagra situadas a distancias adecuadas entre sí son útiles para permitir la formación adecuada de enlaces disulfuro (Tabla 3). Tres enlaces disulfuro en la bisagra dentro del minicuerpo situados a distancias adecuadas entre sí son útiles para la estabilidad de la proteína *in vivo* y la depuración a través del hígado en lugar de la depuración renal. Por lo menos tres disulfuros (o más) en la bisagra son beneficiosos para la conjugación específica de fármacos, quelantes o colorantes fluorescentes. Los Mb construidos como se ha descrito anteriormente conservan una afinidad similar a los anticuerpos originales. En algunas realizaciones, que implican el constructo de IgG1, la primera cys puede dejarse intacta y no parece demasiado deletérea.

En algunas realizaciones, la bisagra de un minicuerpo o minicuerpo biespecífico que comprende una bisagra superior, una bisagra central y una bisagra inferior puede generarse combinando cualquiera de las secuencias de la bisagra superior, cualquiera de las secuencias de la bisagra central y cualquiera de las secuencias de la bisagra inferior como se muestra en la Tabla 3.

En algunas realizaciones, el primer residuo de cisteína en la bisagra puede cambiarse a cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, un residuo de cisteína en la bisagra superior puede cambiarse a cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, un residuo de cisteína en la bisagra central puede cambiarse por cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, dos residuos de cisteína en la bisagra central pueden cambiarse por cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, un residuo de cisteína en la bisagra superior y un residuo de cisteína en la bisagra central pueden cambiarse por cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, un residuo de cisteína en la bisagra superior y dos residuos de cisteína en la bisagra central pueden cambiarse por cualquier aminoácido.

Las secuencias de los constructos para los ejemplos se analizan en las secciones de ejemplo a continuación según corresponda y también se proporcionan en la Tabla 0.2.

EJEMPLO 1 - ESTRUCTURA DE MINICUERPO

El minicuerpo es un homodímero bivalente unido covalentemente de ~80 kDa. Cada monómero (media molécula) se compone de un dominio variable pesado (V_H) enlazado al dominio variable ligero (V_L) correspondiente por una secuencia conectora rica en Gly-Ser de aproximadamente 15-18 aminoácidos. Cada fragmento variable de cadena sencilla (scFv) está enlazado a un dominio C_H3 de IgG humana por una secuencia bisagra.

Las secuencias que abarcan los enlaces disulfuro de la bisagra son importantes y fueron diseñadas para evitar el reordenamiento de disulfuros indeseable con residuos de cisteína presentes en otras regiones de la proteína, así como para contener un número suficiente de pares de cisteína para mantener la integridad del dímero *in vivo* y también como un posible sitio para la conjugación específica del sitio.

Hasta la fecha, la mayoría de los minicuerpos se han manipulado usando las regiones bisagra superior y central de la IgG1 humana nativa con una secuencia de extensión unida al dominio C_H3 de IgG1 humana, como se muestra en la FIG. 1. Como se describe en los siguientes ejemplos, para las varias moléculas diana, a menudo se evaluaron variantes de scFv con ambas orientaciones, V_L-V_H (M1) y V_H-V_L (M2).

Manipulación basada en la IgG1 humana

En bisagras anteriores (por ejemplo, $\gamma 1$ EH1), la primera cisteína en la bisagra (FIG. 2 parte superior) creó problemas que dieron como resultado la heterogeneidad de la proteína como lo demuestran los resultados del análisis de masas intactas usando LC/MS. A pesar de la clara importancia de las cisteínas en la región bisagra, se decidió mutar esta cisteína por una serina, dando como resultado la bisagra $\gamma 1$ EH2 (FIG. 2 parte inferior). Sin embargo, se determinó que esta constructo de bisagra no lograba ciertos aspectos deseados, ya que parecía que los dos enlaces disulfuro que se formaban entre los dos residuos de cisteína restantes en la bisagra central (FIG. 2 parte inferior) no eran adecuados para mantener la estabilidad del dímero *in vivo*.

Mb de IgG2 para superar los problemas de la secuencia bisagra de IgG1

Para abordar los aspectos recientemente introducidos indicados anteriormente, los minicuerpos se manipularon aún más. Los minicuerpos manipulados basados en hulG2 con una secuencia de extensión proporcionaron una tercera cisteína en la bisagra central (una cisteína adicional sobre la bisagra central nativa de IgG1) para aumentar el enlace disulfuro y aumentar la estabilidad de la proteína. Los minicuerpos hulG2 de IAB2M e IAB22M se manipularon usando la secuencia de bisagra de IgG2 humana (hulG2) unida al dominio C_H3 de hulG2.

En las secuencias de bisagra superior y central de IgG2 nativa combinadas con la secuencia de extensión como bisagra inferior (γ2 EH1) se observó un aumento de la agregación. La cisteína reactiva (FIG. 3 parte superior; primera cisteína de la bisagra) fue responsable de la formación de concatémeros en el formato IAB2M- γ2 EH1 con la bisagra nativa de hulG2 (FIG. 3 parte superior) como se observó en el análisis SDS-PAGE mostrado en la FIG. 5A.

Por tanto, de manera similar a lo que se hizo para la bisagra de IgG1 (γ1 EH1), la primera cisteína de la bisagra (que se empareja con la cadena ligera) se mutó a serina, dando como resultado IgG2 EH2 (γ2 EH2) (FIG. 3 parte inferior). Los constructos de unión a antígeno con esta bisagra (γ2 EH2) se expresaron bien y tuvieron una buena estabilidad *in vivo*. Los tres enlaces disulfuro de la bisagra central se formaron correctamente, según se detectó por espectrometría de masas. Se demostró la estabilidad de los constructos IAB2M e IAB22M con γ2 EH2.

Se evaluaron minicuerpos de hulG2 manipulados adicionales con la primera cisteína alterada a una serina y secuencia bisagra superior e inferior nativa (γ2 NH2) y se descubrió que las proteínas eran estables *in vivo* (FIG. 4 parte inferior).

EJEMPLO 2 - DATOS IN VITRO DE IAB2M

La Tabla 1 muestra una visión general de las variantes de IAB2M (las SEQ ID NO se muestran en las FIGS. 5B - 5E). En las FIGS. 47 - 53.

TABLA 1

Nombre	Mut de Bisagra Cys-Ser	Eliminar el término Lys	de N- a C-terminal (SEQ ID NO)
IAB2M-γ1 EH1	No	No	VL (SEQ ID NO: 13); conector (SEQ ID NO: 62); VH (SEQ ID NO: 14); bisagra completa (SEQ ID NO: 22) [bisagra superior (SEQ ID NO: 45), bisagra central (SEQ ID NO: 50), bisagra inferior (SEQ ID NO: 59)]; IgG1 CH3 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
IAB2M-γ1 EH2	Sí	Sí	VL (SEQ ID NO: 13); conector (SEQ ID NO: 62); VH (SEQ ID NO: 14); bisagra completa (SEQ ID NO: 24) [bisagra superior (SEQ ID NO: 46), bisagra central (SEQ ID NO: 50), bisagra inferior (SEQ ID NO: 59)]; IgG1 CH3 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
IAB2M-γ2 EH1	Sí	Sí	VL (SEQ ID NO: 13); conector (SEQ ID NO: 62); VH (SEQ ID NO: 14); bisagra completa (SEQ ID NO: 32) [bisagra superior (SEQ ID NO: 47), bisagra central (SEQ ID NO: 55), bisagra inferior (SEQ ID NO: 59)]; IgG2 CH3 (SEQ ID NO: 42)
IAB2M-γ2 EH2	Sí	Sí	VL (SEQ ID NO: 13); conector (SEQ ID NO: 62); VH (SEQ ID NO: 14); bisagra completa (SEQ ID NO: 34) [bisagra superior (SEQ ID NO: 47), bisagra central (SEQ ID NO: 56), bisagra inferior (SEQ ID NO: 59)]; IgG2 CH3 (SEQ ID NO: 42)

El análisis SDS-PAGE (FIG. 5A) de IAB2M con variantes de bisagra γ1 EH1, γ1 EH2 y γ2 EH1 y γ2 EH2 mostró que se mejoraron en gran medida las proporciones de media molécula a dímero (la media molécula puede disminuirse del 20-30% a menos del 1%) con mutación de la primera cisteína de bisagra en las variantes EH2. La versión γ2 EH2 presentaba una unión disulfuro adecuada y sin concatémeros en comparación con la γ2 EH1 (las SEQ ID NO. en las FIGS. 5B - 5E). Debido a la presencia de la cisteína adicional en la bisagra central (3 en lugar de 2), la variante de bisagra γ2 EH2 presentaba una estabilidad mejorada y tenía menos medias moléculas presentes en comparación con la variante de bisagra γ1 EH2.

La confirmación de la presencia de medias moléculas se realizó mediante análisis de masas intactas. Las muestras de proteína se separaron en condiciones de fase inversa usando la columna TSKgel Phenyl-5PW (2 x 75 mm, Tosoh Biosciences) a 60°C y se analizaron mediante Agilent ESI-QTOF modelo 6538. La FIG. 6A muestra el análisis de masas intactas de la variante IAB2M γ1 EH1. Los cromatogramas de iones totales de la media molécula

separada y de la molécula de tamaño completo se muestran en el panel superior. La traza UV280 (no mostrada) se usó para cuantificar el porcentaje de medias moléculas presentes en la variante de minicuerpo mediante integración de picos. Para la asignación se usaron las masas deconvolucionadas y confirmaron la identidad de las medias moléculas (panel central) y de las masas de tamaño completo (panel inferior). La FIG. 6B muestra el análisis de masas intactas de la variante IAB2M γ2 EH1. El panel superior muestra el cromatograma de iones totales en condiciones de fase inversa. El panel central muestra las masas intactas deconvolucionadas que confirman la presencia de medias moléculas y el panel inferior muestra las masas moleculares de tamaño completo que se identificaron. La FIG. 6C muestra el análisis de masas intactas de la variante IAB2M γ1 EH2. El panel superior muestra el cromatograma de iones totales en condiciones de fase inversa. El panel central muestra las masas intactas deconvolucionadas que confirman la presencia de medias moléculas y el panel inferior muestra las masas moleculares de tamaño completo que se identificaron. La FIG. 6D muestra el análisis de masas intactas de la variante IAB2M γ2 EH2. El panel superior muestra el cromatograma de iones totales. El panel inferior muestra las masas intactas deconvolucionadas que confirman la presencia de las moléculas de masa de tamaño completo. No se detectaron medias moléculas.

El análisis FAC (FIGS. 7A y 7B) de las variantes IAB2M mostró que el cambio de la bisagra de la bisagra estándar usada con anterioridad, γ1 EH1, no tuvo un impacto en la afinidad de unión para el antígeno diana expresado ya sea en células LNCap-AR (FIGS. 5B, 5C, 5D) o células C4-2 XCL (FIGS. 5B, 5C, 5E, 7C).

Para el mapeo de disulfuro para ayudar a entender la formación de las medias moléculas, se prepararon muestras desnaturizando la proteína con 6 M guanidina HCl en Tris pH 7.5. A esto se le añadió 4-vinilpiridina a una concentración de 30 mM seguido de una incubación de 1 h en la oscuridad para tapar la cisteína libre. La solución se diluyó para llevar la concentración de guanidina a 1 M y a continuación se digirió con tripsina/Lys-C. Se dejó que la digestión continuase toda la noche a 37°C. Las muestras se congelaron y se secaron antes de la separación. A continuación se realizó una LC/MS en la que la mezcla de péptidos se separó en TFA acuoso al 0,05% en el gradiente de TFA al 0,05% en acetonitrilo al 90% usando gradiente en la columna Waters Xbridge BEH130 C18 de 4,6 x 150 mm, y las masas se identificaron usando el espectrómetro de masas ESI-QTOT 6538 (Agilent) en el modo positivo y se deconvolucionaron usando el software Agilent Mass Hunter. En la FIG. 8 se muestran los péptidos que contienen disulfuro identificados dentro del dímero IAB2M γ1 EH1.

El mapeo de disulfuros de IAB2M γ1 EH1 demostró la presencia de disulfuros correctamente formados, por ejemplo, esperados, en la región bisagra y también detectó el reordenamiento de disulfuros. La FIG. 8 muestra una tabla de los disulfuros identificados, mientras que la FIG. 9 muestra una ilustración de los resultados. Los disulfuros (FIG. 8) se produjeron entre los residuos de cisteína esperados (cisteínas de la SEQ ID NO: 183 y la SEQ ID NO: 184; cisteínas de la SEQ ID NO: 183 y la SEQ ID NO: 185; SEQ ID NO: 186) y entre residuos de cisteína inesperados presentes en otros dominios de la proteína. Se planteó la hipótesis de que la cisteína no emparejada en la bisagra podría dar lugar a un reordenamiento de disulfuros que desalentaría la formación de disulfuros convencionales (líneas continuas) (FIG. 9). Además, no se observaron los disulfuros V_H (líneas discontinuas), presumiblemente debido a que el péptido tríptico unido por disulfuro no se ionizó (y, por tanto, no se detectó) en el espectrómetro de masas (FIG. 9).

El reformato a hulgG2 EH1 (γ2 EH1) no mejoró la estabilidad de IAB2M. La FIG. 10 muestra una representación gráfica de los disulfuros identificados. Se observó una formación significativa de concatémeros para γ2 EH1 mediante SDS-PAGE (FIG. 5A). Al igual que en IAB2M γ1 EH1, no se observaron disulfuros de V_H (líneas discontinuas), presumiblemente debido a que el péptido tríptico unido por disulfuro no se ionizó de manera eficiente y, por tanto, no se detectó en el espectrómetro de masas. IAB2M γ2 EH1 (FIG. 5D) presentaba >10% de media molécula (39.469,5 Da por LC/MS) (FIG. 10 y FIG. 6B). Se observó una media molécula dominante (pico 1) en los cromatogramas como se muestra en el panel (A) y (B) de la FIG. 10. La FIG. 6A (panel superior) muestra cromatograma de corriente iónica total (TIC) de IAB2Mγ1 EH1 donde los picos 1 y 2 son media molécula y molécula de tamaño completo, respectivamente. La FIG. 6A (panel central) muestra el canal UV280 con integración de picos que permite determinar el porcentaje de media molécula, 11,1%. La FIG. 6A (panel inferior) muestra las masas moleculares que comprenden el pico 2.

La Tabla 3 presenta un resumen de las regiones bisagra.

TABLA 3

	de N- a C-terminal				
Nombre de la bisagra	Bisagra completa			Dominio CH3	
	Bisagra superior	Bisagra central	Bisagra inferior		
γ1 EH1	Bisagra completa (SEQ ID NO: 22)			γ1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)	Bisagra superior y central nativas de IgG1
	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 45)	CPPC (SEQ ID NO: 50)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)		

(continuación)

	de N- a C-terminal				
5	Nombre de la bisagra	Bisagra completa			Dominio CH3
		Bisagra superior	Bisagra central	Bisagra inferior	
10	γ1 EH2	Bisagra completa (SEQ ID NO: 24)			γ1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
		EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPC (SEQ ID NO: 50)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)	C → S
15	γ1 EH3	Bisagra completa (SEQ ID NO: 26)			γ1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
		EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCPPC (SEQ ID NO: 52)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)	C → S
20	γ1 EH4	Bisagra completa (SEQ ID NO: 28)			γ1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
		EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCVECPPC (SEQ ID NO: 53)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)	C → S
25	γ1 EH5	Bisagra completa (SEQ ID NO: 30)			γ1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
		EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCPPCPPC (SEQ ID NO: 54)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)	C → S
30	γ2 EH1	Bisagra completa (SEQ ID NO: 32)			γ2 (SEQ ID NO: 42)
		ERK (SEQ ID NO: 47)	CCVECPPCP (SEQ ID NO: 55)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)	Bisagra superior y central nativas de IgG2
35	γ2 EH2	Bisagra completa (SEQ ID NO: 34)			γ2 (SEQ ID NO: 42)
		ERK (SEQ ID NO: 47)	SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)	C → S
40	γ2 EH2	Bisagra completa (SEQ ID NO: 34)			γ2 (SEQ ID NO: 181)
		ERK (SEQ ID NO: 47)	SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)	T26S, L28A, M57V
45	γ2 EH2	Bisagra completa (SEQ ID NO: 34)			γ2 (SEQ ID NO: 182)
		ERK (SEQ ID NO: 47)	SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)	T26W
50	γ2 NH1	Bisagra completa (SEQ ID NO: 31)			γ2 (SEQ ID NO: 42)
		ERK (SEQ ID NO: 47)	CCVECPPCP (SEQ ID NO: 55)	APPVAGP (SEQ ID NO: 60)	Bisagra nativa IgG2
55	γ2 NH2	Bisagra completa (SEQ ID NO: 33)			γ2 (SEQ ID NO: 42)
		ERK (SEQ ID NO: 47)	SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)	APPVAGP (SEQ ID NO: 60)	C → S
60	γ3/γ1 EH6	Bisagra completa (SEQ ID NO: 35)			γ1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
		ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)	CVECPPCP (SEQ ID NO: 57)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)	Bisagra superior nativa γ3
65	γ3/γ1 EH7	Bisagra completa (SEQ ID NO: 36)			γ1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
		ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)	CPPCPPC (SEQ ID NO: 52)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)	Bisagra superior nativa γ3
	γ3/γ1 EH8	Bisagra completa (SEQ ID NO: 37)			γ1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
		ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)	CPPCPPCPPC (SEQ ID NO: 54)	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)	Bisagra superior nativa γ3

(continuación)

5	de N- a C-terminal				
	Nombre de la bisagra	Bisagra completa			Dominio CH3
		Bisagra superior	Bisagra central	Bisagra inferior	
10	γ1 NH11 NH1	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 45)	CPPC (SEQ ID NO: 50)	APELLGGP (SEQ ID NO: 58)	γ1 (SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41)
15	γ3 NH13 NH1	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (SEQ ID NO: 256)	APELLGGP (SEQ ID NO: 58)	γ3 (SEQ ID NO: 43)
					Bisagra γ1 nativa
					Bisagra γ3 nativa

EJEMPLO 5 - DATOS *IN VITRO* PARA MINICUERPOS IAB22M IGG2

El análisis de masas intactas (FIG. 14A) de la variante IAB22M-γ2 EH1 (FIG. 14B) se realizó por espectrometría de masas. IAB22M con bisagra γ2 EH1 tenía una primera cisteína de bisagra potencial no emparejada que dio como resultado ~9,2% de medias moléculas (FIG. 20B). Para el análisis de masas intactas de IAB22M γ2 EH1, las muestras se separaron mediante una columna de cromatografía de fase inversa (TSKgel Phenyl-5PW (Tosoh, 2 x 75 mm) a 60°C y se analizaron mediante el espectrómetro de masas Agilent ESI-QTOF. La FIG. 14A muestra los cromatogramas de iones totales de la media molécula separada y de la molécula de tamaño completo en el panel superior. Para cuantificar el porcentaje de medias moléculas presentes en la variante de minicuerpo se usó la traza UV280 (no mostrada) mediante integración de picos. Para la asignación y confirmaron la identidad de las medias moléculas (panel central) y de las masas de tamaño completo (panel inferior) se usaron las masas deconvolucionadas.

Sin embargo, el análisis de masas intactas (FIG. 15A) de la variante IAB22M1-γ2 EH2 (FIG. 15B) con la primera cisteína en la bisagra de IgG2 mutada a serina mostró más del 99% de proteína dimerica intacta con γ2 EH2 (MW teórico = 79051.2; MW obtenido 79052). Para el análisis de las masas intactas de IAB22M1 γ2 EH2, se analizó una muestra de proteína mediante LC/MS que consistía en lo siguiente: Waters Synapt G2 HDMS equipado con una fuente Trizaic nanoESI acoplada a un Waters nanoAcquity UPLC. La proteína se separó usando la columna de fase inversa C4 nanotile (150µm ID x 50mm, Waters) operada a 3µl/min con ácido fórmico al 0,1% en agua y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo como fases móviles. El panel superior de la FIG. 15A muestra un barrido de rango completo que muestra la masa molecular dominante única del minicuerpo de tamaño completo. El panel central de la FIG. 15A muestra una región ampliada de los dímeros, por ejemplo, la proteína de tamaño completo. El panel inferior de la FIG. 15A muestra la región ampliada de las medias moléculas. Se detecta una media molécula, pero su abundancia relativa es casi de 3 órdenes de magnitud inferior a la de la proteína de tamaño completo.

Lecciones aprendidas de los constructos iniciales usados para la manipulación de minicuerpos optimizados

Era importante mutar la primera cisteína de la bisagra para evitar el emparejamiento incorrecto de las cisteínas. Sin embargo, más de 2 residuos de cisteína son beneficiosos en la región bisagra para mantener la integridad estructural de la proteína. El empleo de la bisagra de IgG2 proporciona una solución para aumentar la estabilidad *in vivo*. La mutación de la lisina terminal (K) en los constructos de Mb no afectó a la expresión de la proteína, pero sí generó una proteína con una carga más uniforme.

Se evaluaron variantes de Mb adicionales basadas en secuencias de bisagra de IgG3 y modificación de IgG1 en las que la primera cisteína de bisagra estaba mutada y había por lo menos 3 residuos de cisteína en la región bisagra. La Tabla 3 muestra una lista de variantes de bisagra. La primera cisteína nativa en la secuencia bisagra puede mutarse a serina o alanina o a cualquier otro aminoácido. La secuencia de bisagra inferior puede ser una secuencia de extensión (8-25 aminoácidos) o una bisagra inferior nativa de γ1, γ2, γ3 o γ4. El dominio CH3 para cualquier constructo puede ser de γ1, γ2 o γ3 o γ4 y cualquier alelo de origen natural de los mismos. En la FIG. 19 se muestra una ilustración de algunas variantes de bisagra. Para demostrar la universalidad de los resultados se evaluaron los constructos IAB2M, IAB22M, IAB20M e IAB1M.

EJEMPLO 7 - DATOS *IN VITRO* DE LAS VARIANTES DE BISAGRA DE IAB2M, IAB22M, IAB20M E IAB1M

Se realizó el análisis de masas intactas en las variantes de bisagra (FIGS. 5B, 5C, 7C, 5E, 5D) IAB2M (FIG. 20A). También se realizó el análisis de masas intactas en variantes de bisagra (FIGS. 14B, 15B, 20C, 20D, 20E, 20F, 20G) IAB22M (FIG. 20B). Se analizaron los minicuerpos expresados con bisagras manipuladas (EH) para determinar la masa intacta y la cantidad de media molécula (FIGS. 20A y 20B) mediante LC/MS usando un Waters Synapt G2 HDMS equipado con una fuente Trizaic nanoESI acoplada a una columna nanoAcquity UPLC Waters C4 nanotile

(150µm ID x 50mm de longitud) operada a 3µl/min con ácido fórmico al 0,1% en agua y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo como tampones. Para algunas moléculas, las muestras se separaron mediante una columna de cromatografía de fase inversa (TSKgel Phenyl-5PW (Tosoh, 2 x 75 mm) y se analizaron con un espectrómetro de masas Agilent ESI-QTOF.

Se realizaron análisis SDS-PAGE de variantes de Mb de bisagra de IAB2M (FIGS. 5C, 7C, 21B, 21C, 21D, 21E) y variantes Mb bisagra de IAB22M (FIGS. 16B, 15B, 20C, 20D, 20E, 20F, 20G). Los datos resultantes se muestran en las FIGS. 21A y 22A.

Se realizaron análisis de espectrometría de masas para obtener datos que apoyaran los datos de los análisis SDS-PAGE de las FIGS. 21A y 22A. Se evaluaron dos constructos de IAB22M usando espectrometría de masas para confirmar el peso molecular exacto, la cantidad de media molécula y la modificación postraducciona, por ejemplo, recorte de lisina C-terminal. Los constructos de proteínas incluían minicuerpos con bisagras manipuladas EH2, EH3 derivadas de la secuencia IgG1 (γ1 EH2 (FIG. 22B) y γ1 EH3 (FIG. 20C)). Los minicuerpos γ1 con bisagra EH2 se ensamblaron correctamente en moléculas diméricas intactas, pero la inclusión de sólo dos cisteínas dio como resultado una proteína con una elevada cantidad de media molécula. Los minicuerpos γ1 con bisagra EH3 se ensamblaron correctamente en moléculas diméricas intactas y la adición de una tercera cisteína produjo una proteína con niveles muy bajos de media molécula.

En la FIG. 23 se muestra el análisis de masas intactas por espectrometría de masas de IAB22M-γ1 EH1 (FIG. 16B). Las masas moleculares obtenidas indicaron recorte C-terminal. De las 3 especies presentes (MW 79318,9, 79450,1 y 79575,1) sólo una coincidía con el MW previsto de 79576. Las masas moleculares obtenidas indicaban un recorte C-terminal. De las 3 especies presentes (MW 79318,9, 79450,1 y 79575,1) sólo una coincidía con el MW previsto de 79576. El resto eran minicuerpos con una o ambas lisinas C-terminales recortadas. Los Mb construidos con sólo 2 disulfuros en la bisagra produjeron altos niveles de media molécula (~15%). Para el análisis de la masa intacta de IAB22M γ1 EH1, las muestras se separaron mediante una columna de cromatografía de fase inversa (TSKgel Phenyl-5PW (Tosoh, 2 x 75 mm) y se analizaron usando un espectrómetro de masas Agilent ESI-QTOF. La FIG. 23 muestra los cromatogramas de iones totales de la media molécula separada y de la molécula de tamaño completo (panel superior). La traza UV280 (no mostrada) se usó para cuantificar el porcentaje de medias moléculas presentes en la variante de minicuerpo mediante integración de picos. Para la asignación y confirmaron la identidad de las medias moléculas (panel central) y de las masas de tamaño completo (panel inferior) se usaron masas deconvolucionadas.

En la FIG. 24 se muestra el análisis de masas intactas por espectrometría de masas de la variante IAB22M-γ1 EH3 (FIG. 20C). El MW teórico fue de 79946 coincidente con el MW obtenido de 79946. La bisagra de IgG1 modificada construida con tres enlaces disulfuro en la bisagra produjo un minicuerpo con más del 99% de proteína de tamaño completo. Para el análisis de masas intactas, se analizó una muestra de proteína en tampón acetato mediante LC/MS consistente en lo siguiente: Waters Synapt G2 HDMS equipado con una fuente Trizaic nanoESI acoplada a un Waters nanoAcquity UPLC. La proteína se separó usando la columna de fase inversa C4 nanotile (150µm ID x 50mm, Waters) operada a 3µl/min con ácido fórmico al 0,1% en agua y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo como fases móviles. La FIG. 24 (panel superior) muestra el barrido del rango de masas completo. El panel central muestra una región ampliada que muestra la masa molecular intacta. El panel inferior muestra una región ampliada que muestra media molécula.

La Tabla 9 muestra un listado que resume el peso molecular (MW) teórico previsto y la masa MW obtenida por análisis de masas intactas para cinco variantes de bisagra IAB2M (parte superior; FIGS. 5B - 5E, 7C) y siete variantes de bisagra IAB22M (parte inferior; FIGS. 14B, 15B, 20C, 20D; 20E, 43, 44) y el contenido respectivo de media molécula. Las masas reales de las proteínas coincidieron con sus masas moleculares calculadas teóricamente, excepto en los casos en los que se recortaron residuos de lisina terminal C, lo que dio lugar a una heterogeneidad de MW (FIGS. 6, 14A, 15A, 23 y 24).

TABLA 9

Contenido de media molécula obtenido por análisis de masas intactas de IAB2M e IAB22M (*el recorte de lisina C-terminal da lugar a heterogeneidad).

Minicuerpo	Constructo	Masa prevista	Masa obtenida	Porcentaje Media molécula
IAB2M	IAB2M-γ1 EH1	79433.6	79176.6,* 79304, 79433.1	7.6
	IAB2M-γ2 EH1	79197.6	78938.7, 79069.7, 79195.9	11.1
	IAB2M-γ1 EH2	79145	79148	7.1
	IAB2M2-γ2 EH2	78909	78909.2	<0.5
	IAB2M2-γ1 EH3	79739.8	79741.8	<0.5

(Continuación)

Contenido de media molécula obtenido por análisis de masas intactas de IAB2M e IAB22M (*el recorte de lisina C-terminal da lugar a heterogeneidad).				
Minicuerpo	Constructo	Masa prevista	Masa obtenida	Porcentaje Media molécula
IAB22M	IAB22M-γ2 EH1	79576	79318.9, 79450.1, 79575.1	9.2
	IAB22M1-γ2 EH2	79051.5	79053	<0.5
	IAB22M1-γ1 EH3	79946.4	79947.5	<0.1
	IAB22M1-γ1 EH5	80541.2	80540	<0.1
	IAB22M1-γ3/γ1 EH6	80575.2	80576	<0.5
	IAB22M1-γ1 EH7	80312.8	80313.3	<0.5
	IAB22M1-γ1 EH8	80907.6	80907	<0.5

Se realizó un análisis FAC para las variantes de bisagra IAB2M (FIGS. 5E, 7C, 7D, 21B, 21C, 21D, 21E). Todas las variantes de minicuerpo bisagra se unieron con afinidad similar al antígeno diana expresado en células C4-2 XCL (FIG. 26).

Se realizó un análisis FAC para las variantes de bisagra IAB22M (FIGS. 15B, 20C, 20D, 20E, 20F, y 20G). Los minicuerpos elaborados con los mismos scFv y dominios C_H3 pero diferentes bisagras se unieron a la superficie celular CD8 en células HPB-ALL con afinidad similar (FIG. 27).

Se realizó análisis SDS-PAGE (FIG. 28A) para las variantes Mb de bisagra de IAB20M (FIGS. 28B - 28E) confirmando además que los aspectos de la región bisagra indicados en la presente pueden aplicarse a través de una amplia variedad de moléculas diana (por ejemplo, que funciona para una variedad de minicuerpos dirigidos a diferentes moléculas diana). En las FIGS. 54 - 59 se muestran realizaciones adicionales de variantes de IAB20M.

Se realizó análisis SDS-PAGE (FIG. 29A) para las variantes Mb de bisagra de IAB1M (FIGS. 29B - 29D) confirmando además que los aspectos de la región bisagra indicados en la presente pueden aplicarse a través de una amplia variedad de moléculas diana (por ejemplo, que funciona para una variedad de minicuerpos dirigidos a diferentes moléculas diana). En las FIGS. 60 - 65A, 65B, y 65C se muestran realizaciones adicionales de variantes de IAB1M.

EJEMPLO 9

Un minicuerpo de PSCA de la Tabla 0.2 se conjuga con un agente quelante relevante a través de residuos de cisteína en el minicuerpo y posteriormente se radiomarca con un isótopo de In-111 (o alternativamente, zirconio-89 o cobre-64). Alternativamente, el minicuerpo puede radiomarcarse directamente con yodo a través de residuos de tirosina.

El minicuerpo se infunde por vía intravenosa en un sujeto humano sano. El minicuerpo se incuba en el sujeto humano durante 10 minutos después de la infusión. El mismo día de la incubación, se detecta la localización del minicuerpo mediante una exploración PET o un sistema de centelleo externo.

Se usa la localización del minicuerpo para determinar la localización de niveles elevados de PSCA en el sujeto.

EJEMPLO 10

Un minicuerpo de PSMA de la Tabla 0.2 se conjuga con un agente quelante relevante a través de residuos de cisteína en el minicuerpo y posteriormente se radiomarca con un isótopo de In-111 (o alternativamente, zirconio-89 o cobre-64). Alternativamente, el minicuerpo puede radiomarcarse directamente con yodo a través de residuos de tirosina.

El minicuerpo se infunde por vía intravenosa en un sujeto humano sano. El minicuerpo se incuba en el sujeto humano durante 10 minutos después de la infusión. El mismo día de la incubación, se detecta la localización del minicuerpo mediante una exploración PET o un sistema de centelleo externo.

Se usa la localización del minicuerpo para determinar la localización de niveles elevados de PSMA en el sujeto.

EJEMPLO 11

Después de una imagenología con éxito de tumores positivos para PSMA por un minicuerpo de PSMA de la Tabla 0.2, puede investigarse la biodistribución del minicuerpo de acuerdo con las realizaciones de la divulgación. Estos estudios de biodistribución pueden investigar la localización del minicuerpo en el sitio del tumor frente a otros tejidos seleccionados con el tiempo después de la inyección. Estos estudios pueden usarse para demostrar una elevada relación de tumor a fondo. El uso de un minicuerpo probablemente produciría una elevada relación de tumor a fondo al realizar la imagenología de un tumor que sobreexpresa PSMA, como en el cáncer de próstata. Los resultados positivos de estos experimentos de imagenología y biodistribución pueden llevar a experimentos toxicológicos en preparación para estudios clínicos.

Además, puede demostrarse la capacidad de un minicuerpo de dirigirse a PSMA *humano in vivo* mediante estudios de imagenología PET mediante ensayos clínicos en pacientes con cáncer. Brevemente, el minicuerpo radiomarcado puede inyectarse por vía intravenosa en pacientes con cáncer que tienen una forma de cáncer que se sabe que sobreexpresa PSMA. En puntos temporales específicos después de la inyección, puede someterse a cada paciente a una exploración PET en serie. Después de la última exploración, puede someterse a los pacientes a exploración CT para obtener una referencia anatómica. A continuación pueden analizarse las imágenes de PET y CT de cada paciente para evaluar la orientación y especificidad del tumor.

EJEMPLO 12

Se conjuga un minicuerpo de 5T4 de la Tabla 0.2 con un agente quelante relevante a través de residuos de cisteína en el minicuerpo y posteriormente se radiomarca con un isótopo de In-111 (o alternativamente, zirconio-89 o cobre-64). Alternativamente, el minicuerpo puede radiomarcarse directamente con yodo a través de residuos de tirosina.

El minicuerpo se infunde por vía intravenosa en un sujeto humano sano. El minicuerpo se incuba en el sujeto humano durante 10 minutos después de la infusión. El mismo día de la incubación, se detecta la localización del minicuerpo mediante una exploración PET o un sistema de centelleo externo.

Se usa la localización del minicuerpo para determinar la localización de niveles elevados de 5T4 en el sujeto.

EJEMPLO 13

Se proporciona un minicuerpo de 5T4 de la Tabla 0.2. El minicuerpo se infunde por vía intravenosa en un sujeto que tiene cáncer colorrectal, renal, de mama, de ovario, gástrico, de pulmón y/o de próstata en una cantidad adecuada para que se una a niveles suficientes de 5T4 en el sujeto para proporcionar una disminución de los síntomas de cáncer colorrectal, renal, de mama, de ovario, gástrico, de pulmón y/o de próstata en el sujeto.

EJEMPLO 14

Se conjuga un minicuerpo de CD8 de la Tabla 0.2 con un quelante relevante a través de residuos de cisteína en el minicuerpo y posteriormente se radiomarca con un isótopo de In-111 (o alternativamente, zirconio-89 o cobre-64). Alternativamente, el minicuerpo puede radiomarcarse directamente con yodo a través de residuos de tirosina.

El minicuerpo se infunde por vía intravenosa en un sujeto humano sano. El minicuerpo se incuba en el sujeto humano durante 10 minutos después de la infusión. El mismo día de la incubación, se detecta la localización del minicuerpo mediante una exploración PET o un sistema de centelleo externo.

Se usa la localización del minicuerpo para determinar la localización de CD8 en el sujeto.

EJEMPLO 15

Se proporciona un minicuerpo de CD8 de la Tabla 0.2. El minicuerpo se infunde por vía intravenosa en un sujeto humano sano.

El minicuerpo se incuba en el sujeto humano durante 1 hora después de la infusión. Se proporciona un anticuerpo secundario, un minicuerpo humanizado que se une específicamente al minicuerpo de CD8 y está conjugado con ³³P. En el mismo día de la incubación, se infunde al sujeto el anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario se incuba durante una hora. La localización del minicuerpo se detecta mediante imagenología PET, a través de un marcador en el anticuerpo secundario.

Se usa la localización del minicuerpo para determinar la localización de CD8 en el sujeto.

EJEMPLO 16

Se proporciona un minicuerpo de CD8 de la Tabla 0.2. El minicuerpo se infunde por vía intravenosa en un sujeto que padece un trastorno relacionado con CD8 en una cantidad adecuada para que se una a niveles suficientes de CD8 en el sujeto para proporcionar una disminución de los síntomas del trastorno relacionado con CD8. El minicuerpo se conjuga con itrio-90.

EJEMPLO 17

Se proporciona un minicuerpo de CD8 de la Tabla 0.2. El minicuerpo se inyecta en un paciente que ha sido vacunado con un antígeno de una enfermedad infecciosa o con un antígeno asociado a un tumor. Los fragmentos dirigidos a CD8 aumentan la respuesta inmunitaria y potencian la actividad citolítica de las células T que expresan CD8.

EJEMPLO 18

Se proporciona un minicuerpo de CD8 de la Tabla 0.2. El minicuerpo se infunde por vía intravenosa en un sujeto que tiene un trastorno relacionado con CD8 en una cantidad adecuada para que se una a niveles suficientes de CD8 en el sujeto para proporcionar una disminución de los síntomas del trastorno relacionado con CD8. El minicuerpo se conjuga con Lu-177. El minicuerpo de CD8 se une a una célula que expresa CD8 y la Lu-177 provoca la muerte de la célula.

Los resultados indicaron que los constructos aún se unen al CD8 humano celular.

EJEMPLO 19

Se conjuga un minicuerpo de CD3 de la Tabla 0.2 con un agente quelante pertinente a través de residuos de cisteína en el minicuerpo y posteriormente se radiomarca con un isótopo de In-111 (o alternativamente, circonio-89 o cobre-64). Alternativamente, el minicuerpo puede radiomarcarse directamente con yodo a través de residuos de tirosina.

El minicuerpo se infunde por vía intravenosa en un sujeto humano sano. El minicuerpo se incuba en el sujeto humano durante 10 minutos después de la infusión. El mismo día de la incubación, se detecta la localización del minicuerpo mediante una exploración PET o un sistema de centelleo externo.

Se usa la localización del minicuerpo para determinar la localización de niveles elevados de CD3 en el sujeto.

EJEMPLO 20

Se proporciona un minicuerpo de CD3 de la Tabla 0.2. El minicuerpo se infunde por vía intravenosa en un sujeto que tiene artritis reumatoide en una cantidad adecuada para que se una a niveles suficientes de CD3 en el sujeto para proporcionar una disminución de los síntomas de la artritis reumatoide en el sujeto.

EJEMPLO 21

Se identifica un sujeto en riesgo de desarrollar una tormenta de citoquinas inaceptablemente intensa por la administración de OKT3. El sujeto tiene la necesidad de reducir el nivel de proteínas CD3 en su sistema ya que el sujeto tiene un trastorno dependiente de CD3. Se selecciona uno de los minicuerpos de CD3 proporcionados en la presente y se administra al sujeto a un nivel que sea eficaz para que se produzca una unión adecuada a CD3, sin que se produzca una tormenta de citoquinas.

EJEMPLO 22

Se proporciona un minicuerpo de CD3 humanizado de la Tabla 0.2. El minicuerpo se infunde por vía intravenosa en un sujeto humano sano. El minicuerpo se incuba en el sujeto humano durante 1 hora después de la infusión. Se proporciona un anticuerpo secundario, un minicuerpo humanizado que se une específicamente al minicuerpo de CD3 y está conjugado con ³²P. Inmediatamente después de la incubación de una hora, se infunde en el sujeto el anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario se incuba durante una hora. Inmediatamente después de la incubación de una hora del anticuerpo secundario, se detecta la localización del minicuerpo mediante imagenología PET.

Se usa la localización del minicuerpo para determinar la localización de CD3 en el sujeto.

EJEMPLO 23

Se identifica un sujeto en riesgo de desarrollar una tormenta de citoquinas inaceptablemente intensa por la administración de OKT3. El sujeto tiene la necesidad de reducir el nivel de proteínas CD3 en su sistema ya que el

sujeto tiene un trastorno dependiente de CD3. Se selecciona uno del minicuerpo o los minicuerpos del presente ejemplo y se administra al sujeto a un nivel que sea eficaz para que se produzca una unión adecuada a CD3, sin que se produzca una tormenta de citoquinas.

5 Si es necesario, el minicuerpo o minicuerpos pueden conjugarse con un agente terapéutico para el tratamiento del trastorno dependiente de CD3.

El sujeto puede padecer cualquiera de una serie de trastornos particulares dependientes de CD3 que, alternativamente, pueden ser artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1 o lupus eritematoso.

10

EJEMPLO 24

Se proporciona un minicuerpo de PSCA de la Tabla 0.2. El minicuerpo se infunde por vía intravenosa en un sujeto que tiene un trastorno relacionado con PSCA en una cantidad adecuada para que se una a niveles suficientes de PSCA en el sujeto para proporcionar una disminución de los síntomas del trastorno relacionado con PSCA. El minicuerpo se conjuga con itrio-90.

15

EJEMPLO 25

Se proporciona un minicuerpo de PSMA de la Tabla 0.2. El minicuerpo se infunde por vía intravenosa en un sujeto que tiene un trastorno relacionado con PSMA en una cantidad adecuada para que se una a niveles suficientes de PSMA en el sujeto para proporcionar una disminución de los síntomas del trastorno relacionado con PSMA. El minicuerpo se conjuga con itrio-90.

20

En esta solicitud, el uso del singular puede incluir el plural a menos que se indique específicamente lo contrario o a menos que, como entenderán los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación, el singular sea la única realización funcional. Por tanto, por ejemplo, "uno" puede significar más de uno, y "una realización" puede significar que la descripción se aplica a múltiples realizaciones.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un minicuerpo que comprende una región bisagra que comprende:

5 una región bisagra superior que no comprende aminoácidos capaces de reticularse con un aminoácido correspondiente; y
una secuencia CPPCPPC (SEQ ID NO: 52), en donde la SEQ ID NO: 52 se localiza como región bisagra central del minicuerpo,
10 en donde la región bisagra central está conectada a un extremo C-terminal de la región bisagra superior, el minicuerpo comprendiendo además una bisagra inferior o secuencia de extensión conectada en el extremo C-terminal a la región bisagra central,
en donde la región bisagra no comprende cisteínas en la región bisagra superior.

15 2. El minicuerpo de la reivindicación 1, en donde la región bisagra superior comprende una secuencia EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46).

3. El minicuerpo de cualquier reivindicación anterior que comprende una secuencia de región bisagra de EPKSSDKTHTCPPCPPC (SEQ ID NO: 168).

20 4. El minicuerpo de cualquier reivindicación anterior, en donde la región bisagra comprende además una región bisagra o extensión inferior conectada C-terminal a la región bisagra central, en donde la secuencia de bisagra o extensión inferior es por lo menos una de: APPVAGP (SEQ ID NO: 60), APELLGGP (SEQ ID NO: 58), y/o GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59).

25 5. El minicuerpo de cualquier reivindicación anterior, que comprende una secuencia de región bisagra de EPKSSDKTHTCPPCPPCGGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 26).

6. El minicuerpo de cualquier reivindicación anterior, en donde el minicuerpo está humanizado.

30 7. Una composición farmacéutica que comprende un minicuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

35

40

45

50

55

60

65

orientación M1

S	V _L	L	V _H	H	CH3
---	----------------	---	----------------	---	-----

orientación M2

S	V _H	L	V _L	H	CH3
---	----------------	---	----------------	---	-----

- S = péptido señal
- V_H = cadena pesada de dominio variable
- L = conector
- V_L = cadena ligera de dominio variable
- H = bisagra
- CH3 = dominio CH3

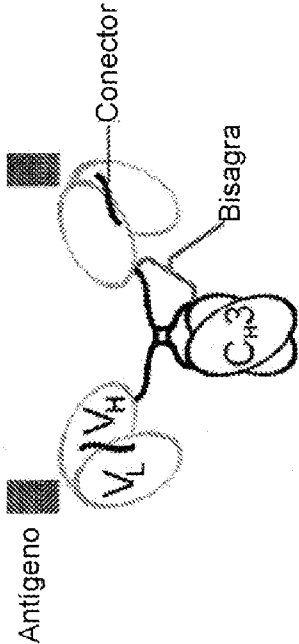


FIG. 1

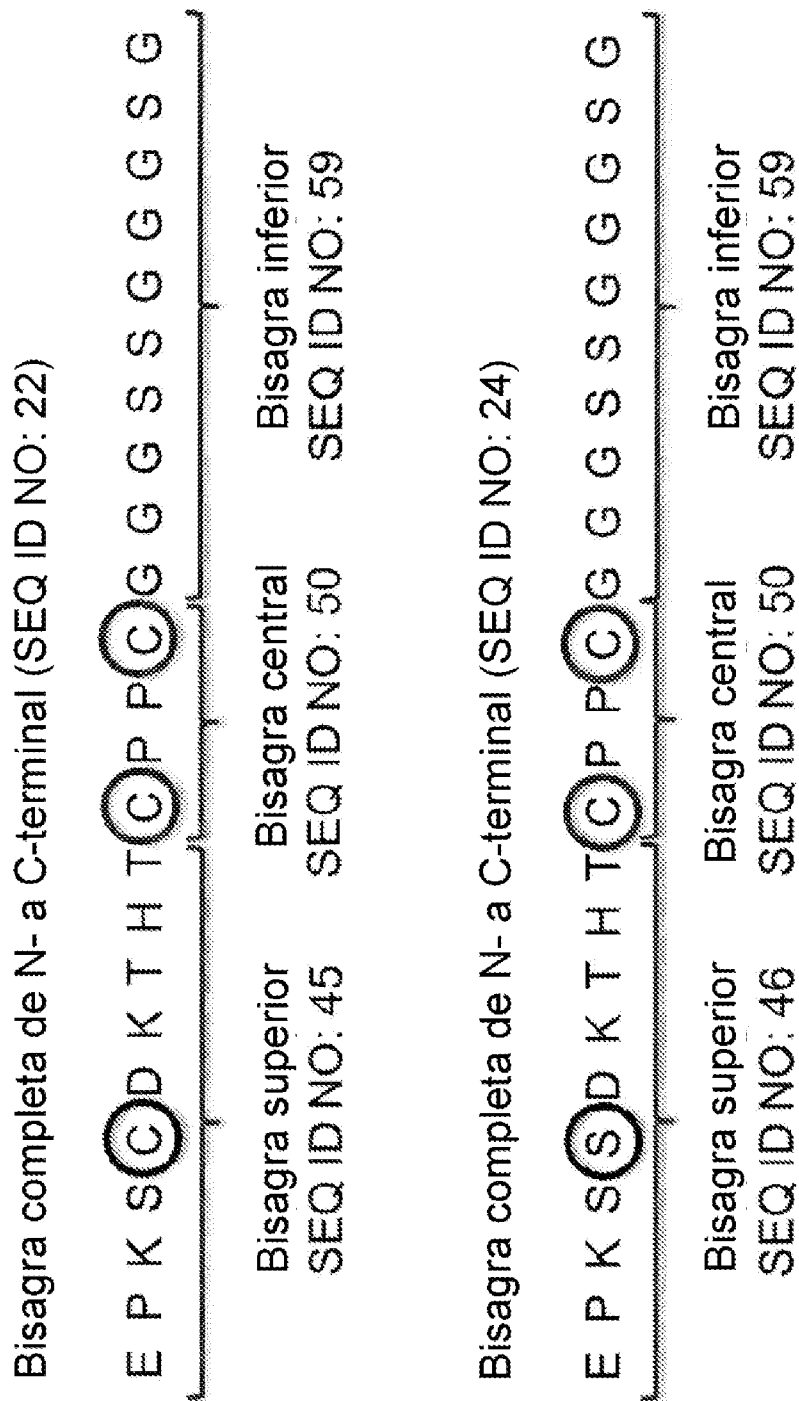


FIG. 2

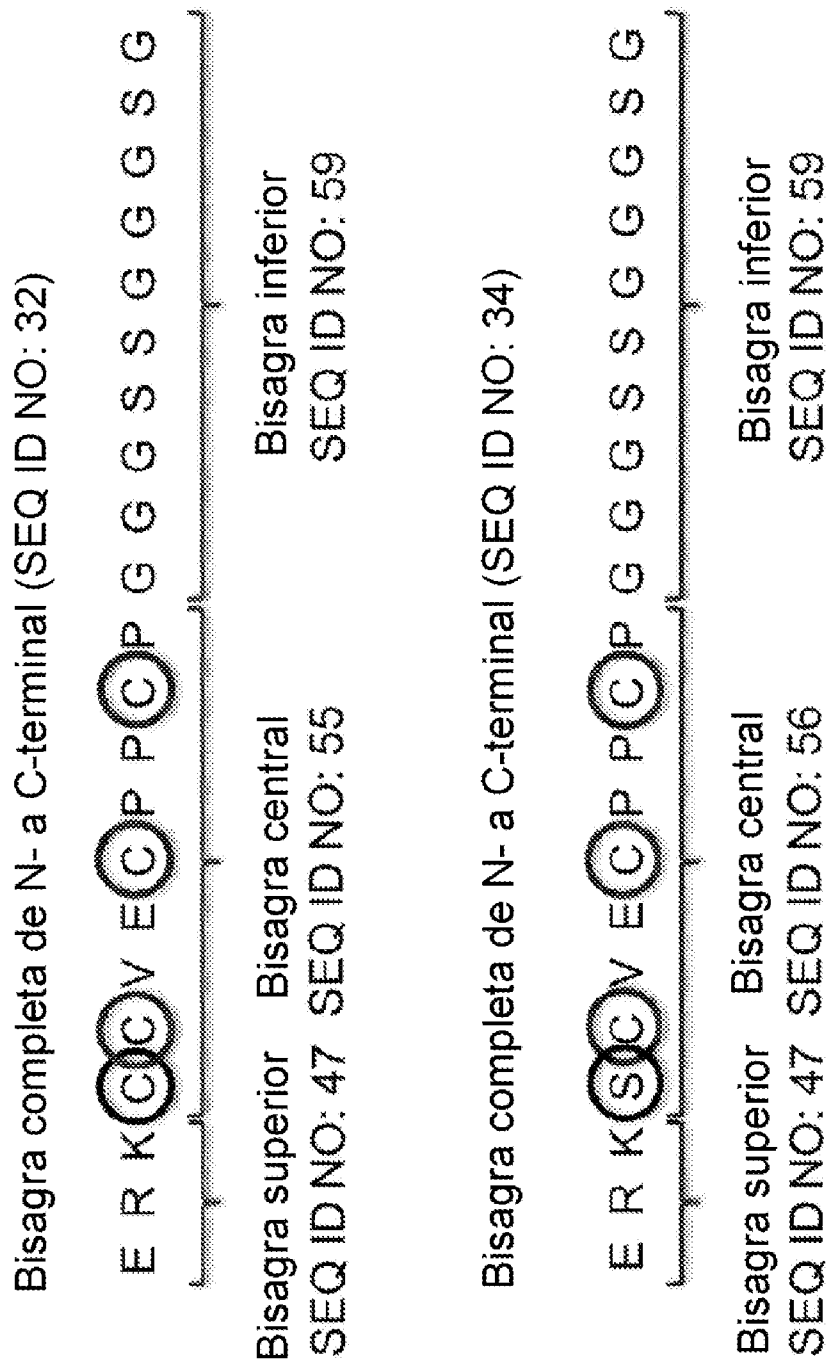


FIG. 3

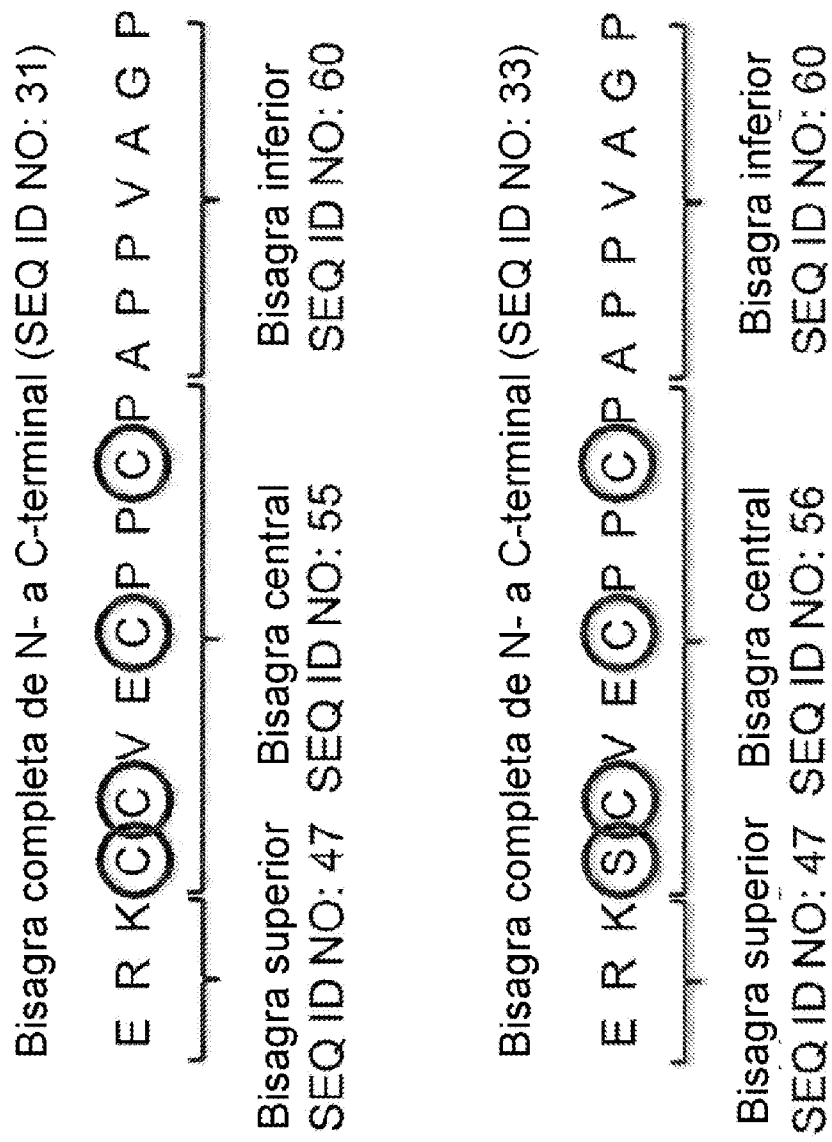


FIG. 4

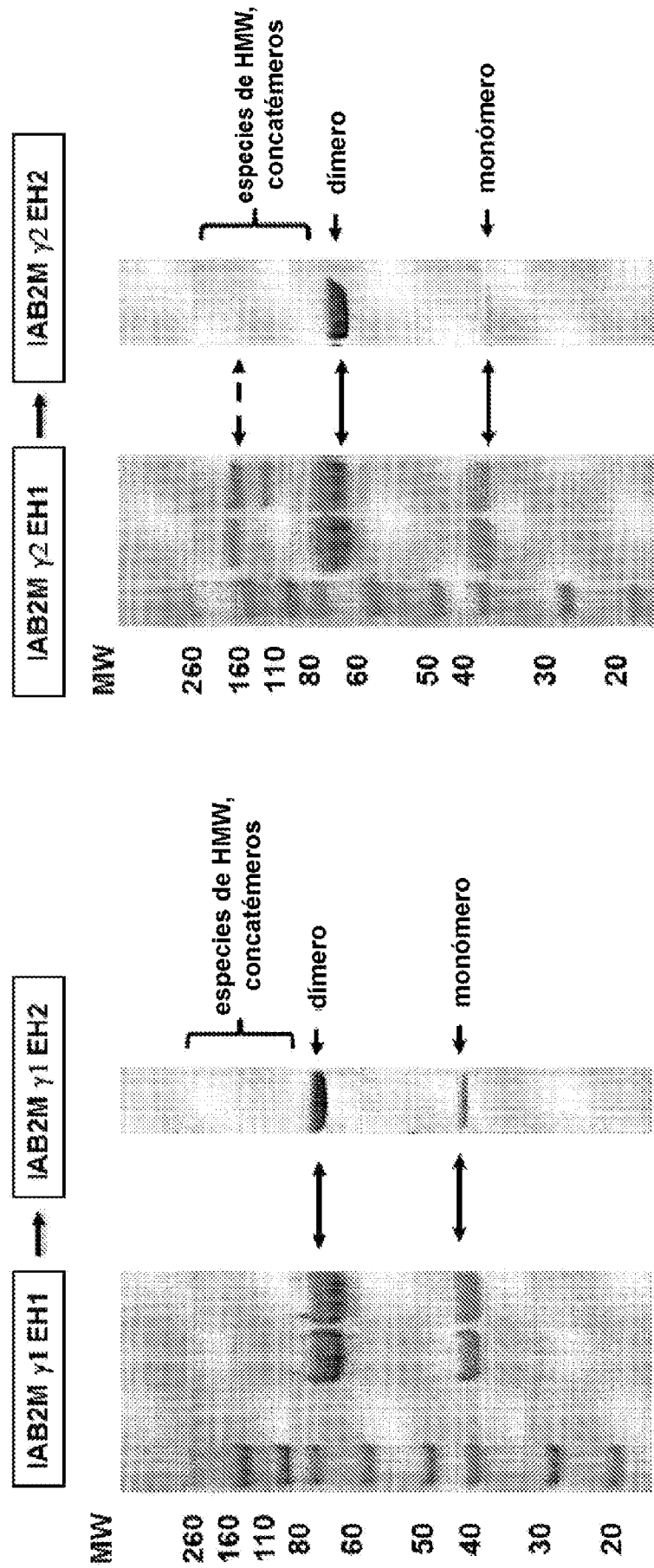


FIG. 5A

IAB2M γ 1 EH1 (de N- a C-Terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-PSMA
 DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLT
 ISSLPEDFADYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 13)

Conector
 GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia ligera pesada (VH) anti-PSMA
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRATLTVDK
 STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTITVSS (SEQ ID NO: 14)

Bisagra completa (EH1)
 EPKSCDKTHTCPPCGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 22)

Bisagra superior
 EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 45)

Bisagra central
 CPPC (SEQ ID NO: 50)

Bisagra inferior
 GGGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 Humana (alotipo G1m1)
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 Humana (alotipo nG1m1)
 GQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 5B

IAB2M γ 1 EH2 (de N- a C-Terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-PSMA
 DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTL
 TISSLPQPEDFADYFCQQYNSYPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 13)

Conector
 GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia ligera pesada (VH) anti-PSMA
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRATLTVD
 KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGGGTTVTSS (SEQ ID NO: 14)

Bisagra completa (EH2)
 EPKSSDKTHTCPPCGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 24)

Bisagra superior
 EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)

Bisagra central
 CPPC (SEQ ID NO: 50)

Bisagra inferior
 GGGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 Humana (alotipo G1m1)
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 Humana (alotipo nG1m1)
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 5C

IAB2M γ 2 EH2 (de N- a C-Terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-PSMA

DIVMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFT
LTISSLQPEDFADYFCQQNSYPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 13)

Conector

GSTSGGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-PSMA

EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRATLTVD
KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 14)

Bisagra completa (EH2)

ERKSCVECPPCPGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 34)

Bisagra superior

ERK (SEQ ID NO: 47)

Bisagra central

SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)

Bisagra inferior

GGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG2 humana

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMILDSGSGFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

FIG. 5D

IAB2M γ 2 EH1 (de N- a C-Terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-PSMA
 DIVMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTL
 TISSLPEDFADYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 13)

Conector
 GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-PSMA
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRATLTVD
 KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGGGTTTVSS (SEQ ID NO: 14)

Bisagra completa (EH1)
 ERKCCVECPPCPGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 32)

Bisagra superior
 ERK (SEQ ID NO: 47)

Bisagra central
 CCVECPPCP (SEQ ID NO: 55)

Bisagra inferior
 GGGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG2 Humana
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSGFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

FIG. 5E

Análisis de masas intactas de IAB2M y EH1

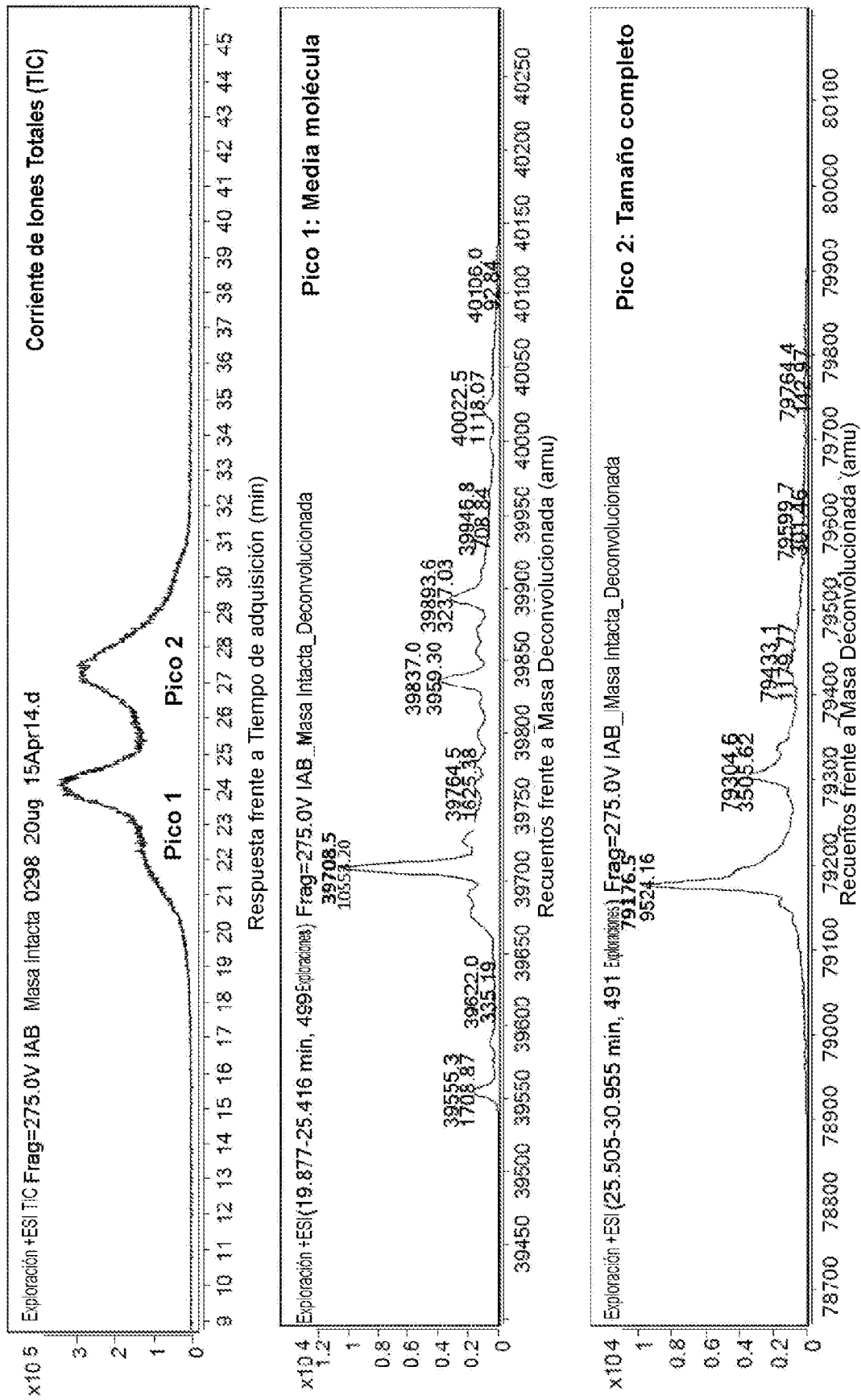


FIG. 6A

Análisis de masas intactas de IAB2M γ2 EH1

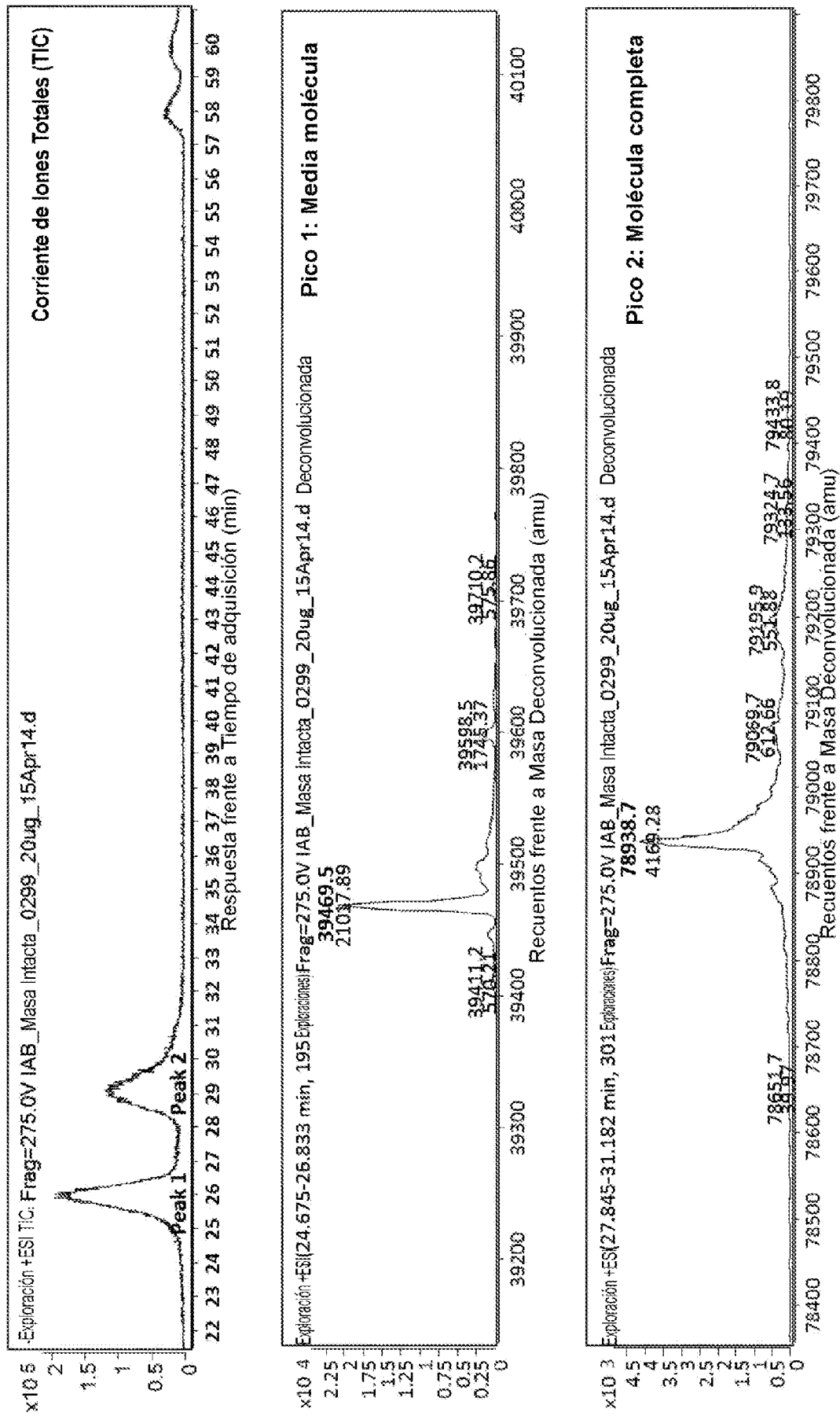


FIG. 6B

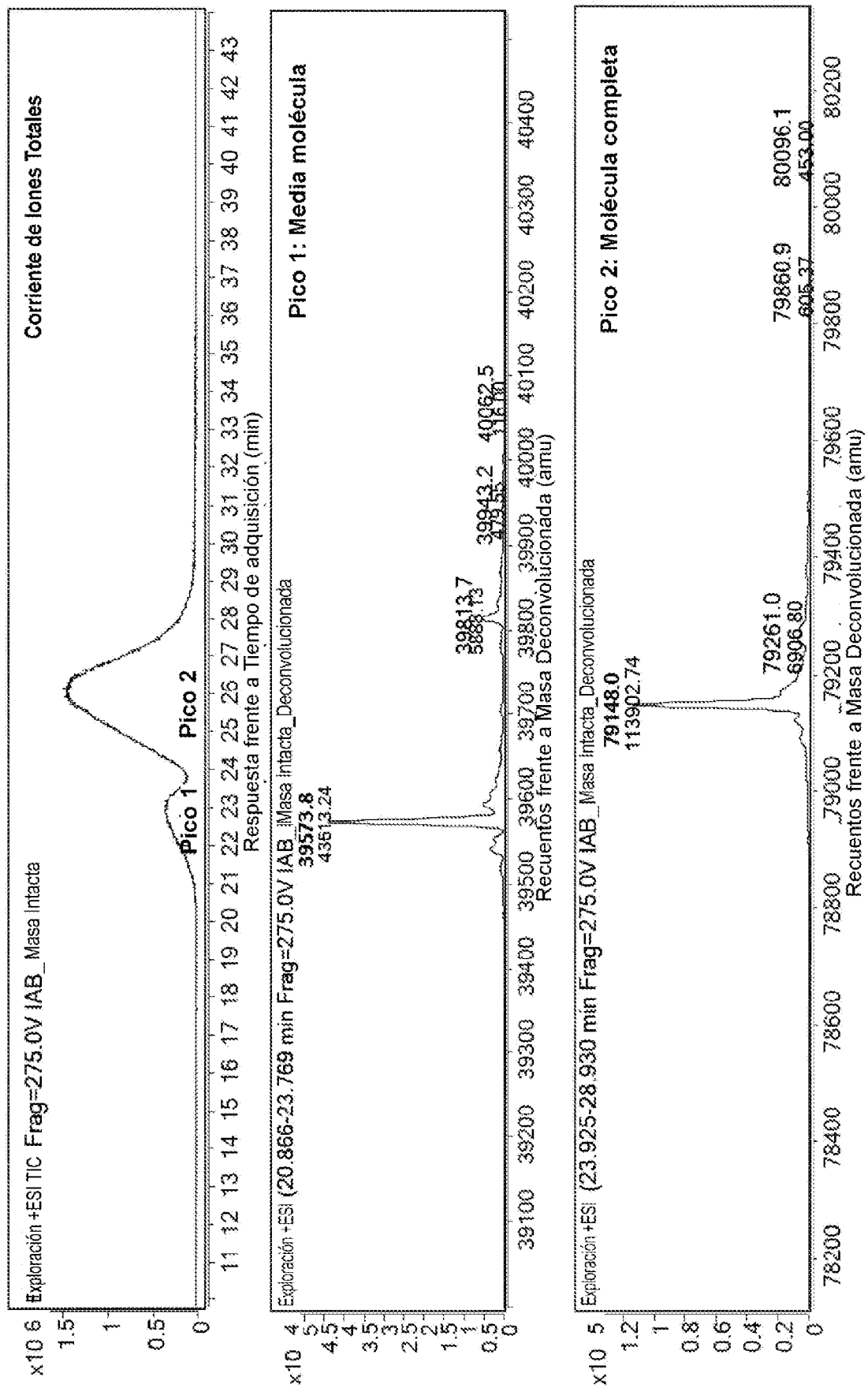
Análisis de masas intactas de IAB2M γ 1 EH2

FIG. 6C

Análisis de masas intactas de IAB2M γ2 EH2

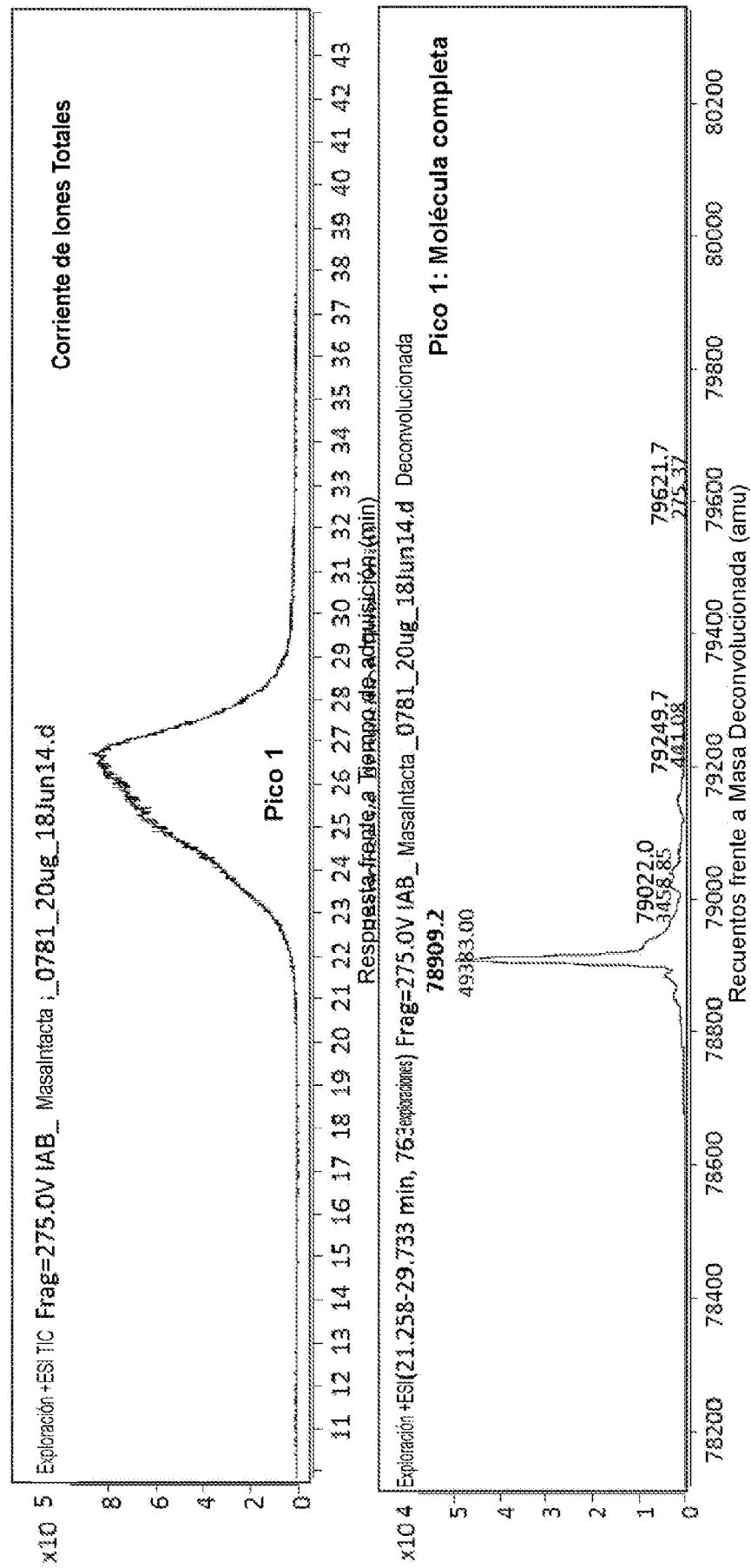
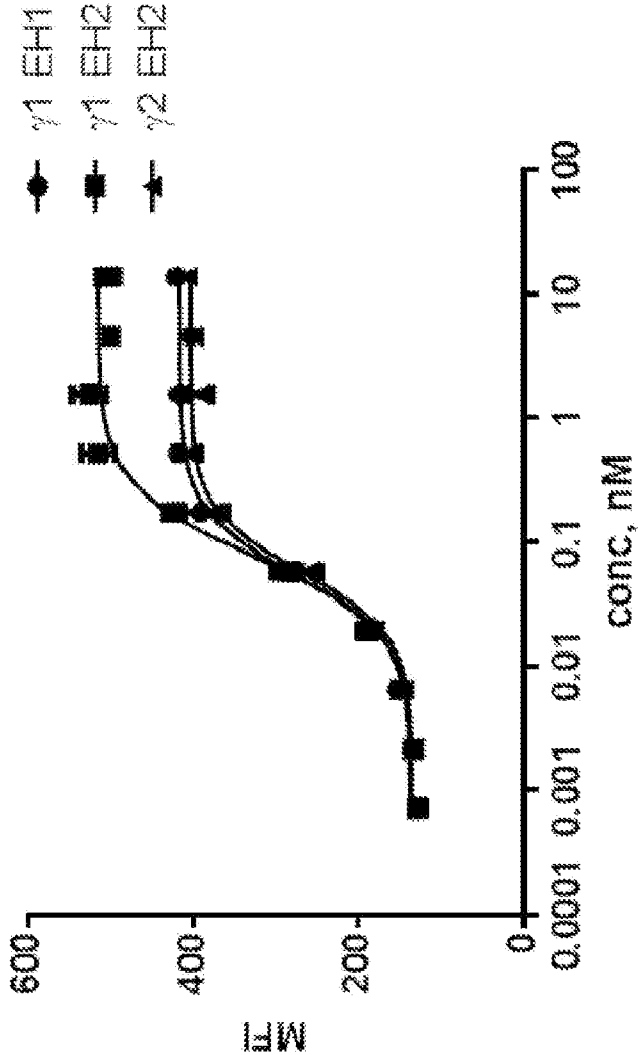


FIG. 6D

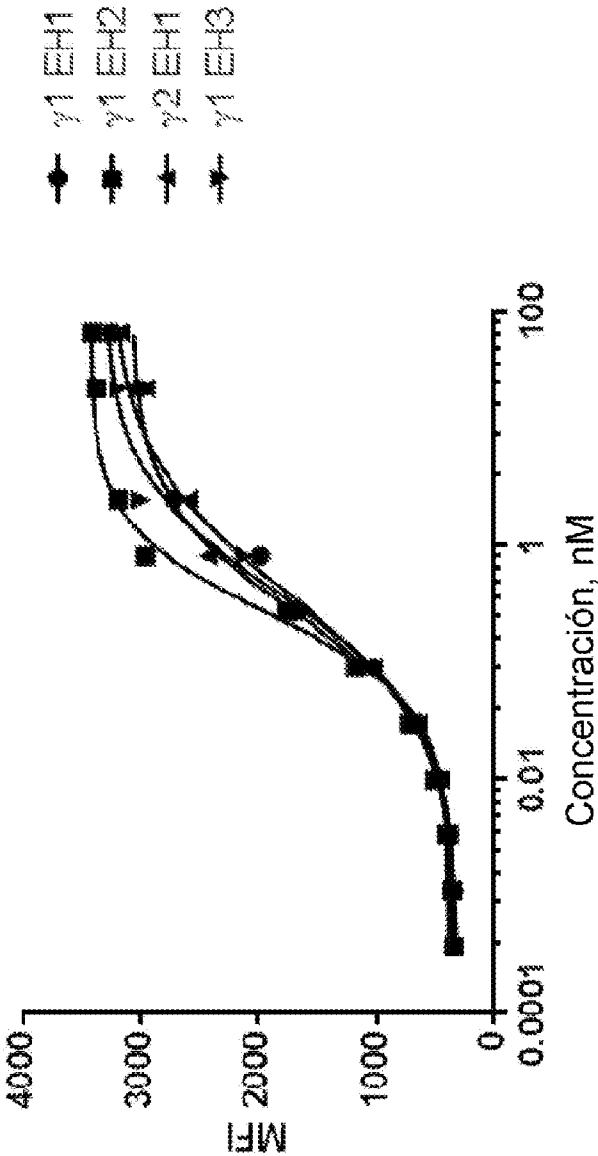
Variantes de bisagra IAb2M que se unen a células LNCaP-AR



variante	$\gamma 1$ EH1	$\gamma 1$ EH2	$\gamma 2$ EH2
EC50, nM	0.05	0.06	0.05

FIG. 7A

Variantes de bisagra IAb2M que se unen a células C4-2 XCL



variante	γ1 EH1	γ1 EH2	γ2 EH1	γ1 EH3
EC50, nM	0.4	0.26	0.27	0.38

FIG. 7B

IAB2M γ 1 EH3 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-PSMA
 DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFT
 LTISLQPEDFADYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 13)

Conector
 GSTSGGGGGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-PSMA
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGTTYNQKFEDRATLTVD
 KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGGGTTVTSS (SEQ ID NO: 14)

Bisagra completa (EH3)
 EPKSSDKTHTCPPCPGCGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 26)

Bisagra superior
 EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)

Bisagra central
 CPPCPPC (SEQ ID NO: 52)

Bisagra inferior
 GGGSSGGGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 7C

IAB2M γ 1 EH3 (de N- a C-terminal)

IAB2M γ 1 EH3 (M1) (SEQ ID NO: 7)
 DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDR
 FTGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIKGSTSGGSGGGGG
 GSSEVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTT
 YNQKFEDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTITVTSSEPKSS
 DKHTCPPCPPCGGSGGGGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPG (SEQ ID NO: 7)

IAB2M γ 1 EH3 (M2) (SEQ ID NO: 10)
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQ
 KFEDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTITVTSSTSGGGG
 GGGSGGGSSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWA
 STRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIKPKSSD
 KTHTCPPPCPPCGGSGGGGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPG (SEQ ID NO: 10)

FIG. 7D

IAB2M γ 1 EH3

IAB2M γ 1 EH3 (M1) (SEQ ID NO: 162)
 gatattgtgatgacccagagcccgagcagcctgagcggagcggtggcgatcgctgacc
 attacctgcaaaaggagccaggatgtggcacccgggtggattggtatcagcagaaaccg
 ggcaagcgccgaaactgctgatttattggcgagcaccggccataccggcggtgcggat
 cgcttaaccggcagcgcgagcgccacggattttaccctgaccattagcagccctgcagccg
 gaagattttgcggattattttgccagcagtagataacagctatccgctgaccttggcggc
 ggaccaaactggaaattaaaggcagcaccagcgggcgggcagcgcgcgagcggc
 ggcgggcgagcagcgaagtgcagctggtgcagagcgcgcggaagtgaataaacgggc
 gcgagcgtgaaaattagctgcaaaaccagcggtatacccttaccgaataataccattcat
 tgggtgaacacagggcgagcggaaggccttggaatggattggcaacattaacccgaacaac
 ggcggcaccacctataaccagaaattgaagatcgcgcgacccctgacctggataaaagc
 accagcacccgctatatggaaactgagcagcctgcgcagcgaagataaccgcggtgtattat
 tgcgcggcggtggaaactttgattatttggggccaggccaccacccgtgacctgagcagc
 gaaccgaaaagcagcgataaaaaccataacctgcccgcgtgcccggtgcggcgggc
 agcagcgcgcgcgagcgcgccagcgcgcggaaccgcaggtgtataccctgcccgcg
 agccgcgaagaatgaccaaataaccaggtagcctgacctgacctggtgaaaggctttat
 ccgagcgatatattgcggtggaaatgggaaagcaacggccagccggaataataaaacc
 accccgcggtgctggatagcgatggcagctttttctgtatagcaaaactgacctggat
 aaaagccgctggcagcagggcaacgtgttttagctgcagcgtgatgcatgaagcgtcat
 aaccattatacccaaaaagcctgagcctgagccccggc (SEQ ID NO: 162)

FIG. 7E

IAB2M γ 1 EH3

IAB2M γ 1 EH3 (M2) (SEQ ID NO: 165)
 gaagtcagctggtgcagagcggcggaagtgaataaaacggcgagcgtgaaatt
 agctgcaaaaaccagcggctataacctttaccgaataataccattcattgggtgaacagggc
 agcggaaggcctggaaatggattggcaacattaaccgaaacacggcgaccacctat
 aaccagaaattgaagatcgcgacccctgaccctgacgggtgataaaagcaccagcaccggtat
 atggaactgagcagcctgcgagcgaagataccgctggtgtattattgcggcggtgg
 aacttgattattggggccaggccaccacgtgaccgtgagcagcgagcaccagcggc
 ggcggcagcggcgcgagcggcgggcgggcgagcagcgatattgtatgaccagagc
 ccgagcagcctgagcgcgagcgtggcgatcgctgaccattacctgcaagcgagccag
 gatgtgggcacccggtgattggtatcagcagaacccgggcaaaagcgcgaactgctg
 attattgggcgagcacccgccataccggcgctgccggatcgcttaccggcgagcggcagc
 ggcaaccgattttaccctgaccattagcagcctgcagcgggaagattttgcggattttt
 tgccagcagtataacagctatccgctgacctttggcgggcgaccacaaactggaaattaaa
 gaaccgaaaagcagcgataaaacccataacctgcccgcgtgcccgccgtgcggcgggc
 agcagcggcgggcgagcggcgccagccgcgcgaaccgcaggigtatataccctgccgcg
 agccggaagaaatgaccaaaaaccagggtgagcctgacctgacctggtgaaaggctttat
 ccgagcgtattgcggtggaatgggaagcaacggccagcggaaacaaactataaaacc
 acccgccggtgctgtagcgtatggcagctttttctgtagcaaaactgaccgtggat
 aaaagccgctggcagcagggaacgctgttagctgcagcgtgatgcatgaagcgtgcat
 aaccattataccagaaaaggcctgagcctgagccccggc (SEQ ID NO: 165)

FIG. 7E continuación

Péptidos que contienen disulfuro identificados dentro del dímero IAB2M γ1 EH1

Enlace/ Modificación	Localización de secuencia ^a	Secuencia	Masa Teór. (Da) ^b	Masa Obs. (Da) ^c	Delta ppm	RT (mins)	Abundancia ^d
No observados	A22-A96	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Enlace cisteína disulfuro (A156- A221)*	A(152-157) + A(195-236)	VTTICK [SEQ ID NO: 183] + FTGSGGTDFLTITSSLPEDFADYFCQQNSYPL TFGGGTK [SEQ ID NO: 184]	5208.3897	5208.3864	-0.63	89.9	1580663
Enlace cisteína disulfuro (A156- A221)*	A(152-157) + A(188-236)	VTTICK + [SEQ ID NO: 183] HTGVPRFTGSGGTDFLTITSSLPEDFADYFCQ QNSYPLTFGGGTK [SEQ ID NO: 185]	5970.7669	5970.7586	-1.40	86.1	166671
Enlace cisteína disulfuro (A251-B251) Enlace cisteína disulfuro (A254-B254)	A(248-268) + B(248-268)	THTCPPCGGGSSGGGGQPR [SEQ ID NO: 186] + THTCPPCGGGSSGGGGQPR [SEQ ID NO: 186]	3707.5067	3707.5060	-0.18	22.1	583626
Enlace cisteína disulfuro (A245- A291)	A(244-247) + A(285-294)	SCDK [SEQ ID NO: 187] + NQVSLTCLVK [SEQ ID NO: 188]	1552.7589	1552.7590	0.07	43.8	84406
Enlace cisteína disulfuro (A291- A349)*	A(285-294) + A(341-363)	NQVSLTCLVK [SEQ ID NO: 188] + WQQGNVFC ^c SVMEALHNHYTQK [SEQ ID NO: 189]	3844.8236	3844.8202	-0.89	55.2	4949532
Enlace cisteína disulfuro (A291- A349)*	A(285-294) + A(339-363)	NQVSLTCLVK [SEQ ID NO: 188] + SRWQQGNVFC ^c SVMEALHNHYTQK [SEQ ID NO: 190]	4087.9568	4087.9615	1.16	54.0	647751
Alquilación (vinil piridina)(A291)	A(285-294)	NQVSLTCLVK [SEQ ID NO: 188]	1208.6587	1208.6578	-0.81	47.2	51583
Alquilación (vinil piridina)(A349)	A(341-363)	WQQGNVFC ^c SVMEALHNHYTQK [SEQ ID NO: 189]	2848.2962	2848.2955	-0.24	49.1	74838

^aLocalización de secuencia A, cadena pesada N°1; B, cadena pesada N°2^bLas masas moleculares teóricas (monoisotópicas) se calcularon usando el software MassHunter Bioconfirm (Agilent, Santa Clara, CA).^cLas masas observadas (monoisotópicas) están todas dentro de 3ppm de su valor teórico.^dLas abundancias se determinaron usando el software MassHunter (Agilent, Santa Clara, CA).

RT: tiempo de retención.

* Péptidos que muestran escisiones alternativas

FIG. 8

Ilustración de un mapeo de enlaces disulfuro de IAB2M γ EH1
(SEQ ID NO: 179)

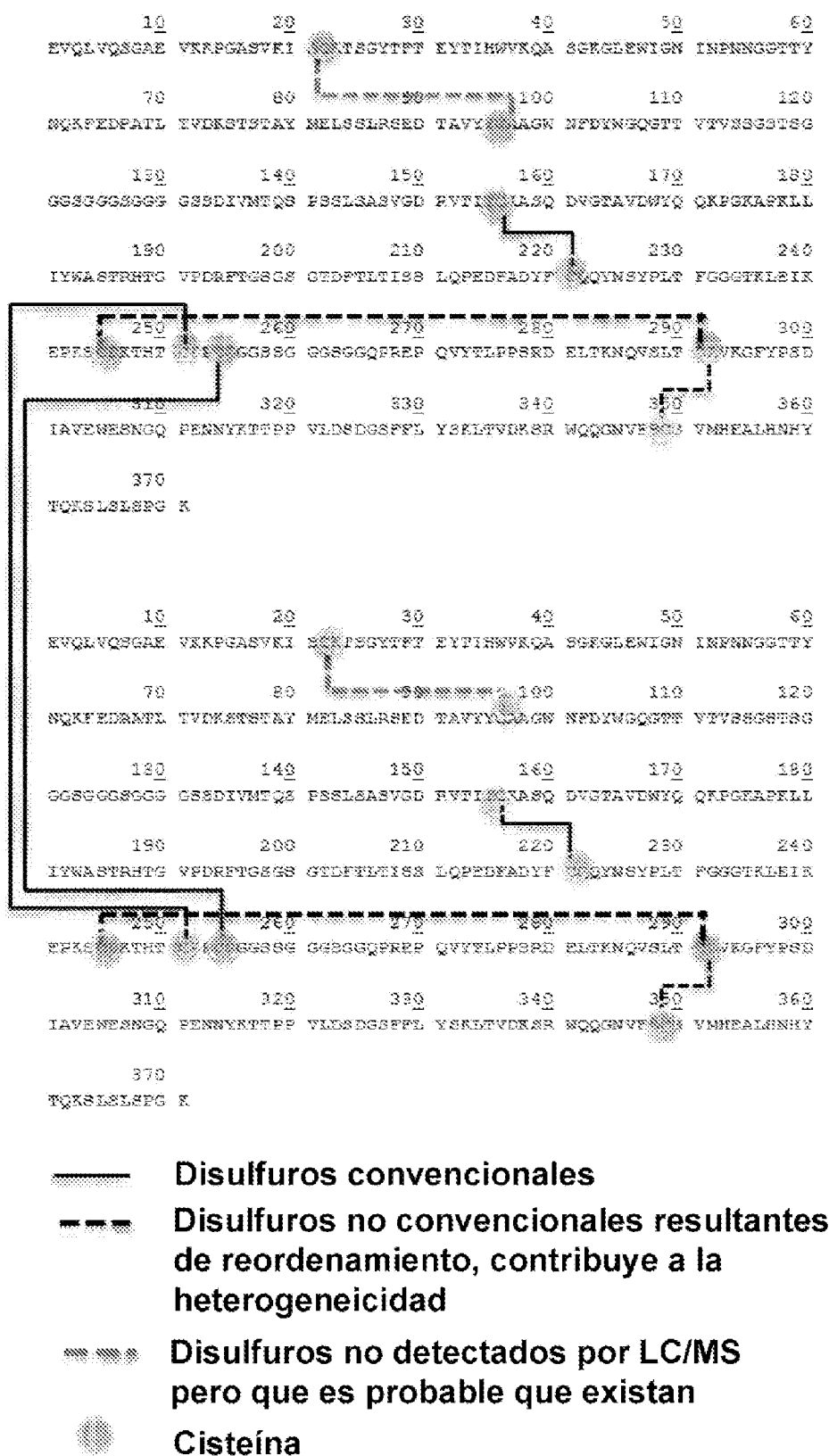


FIG. 9

Ilustración de un mapeo de enlaces disulfuro de IAB2M $\gamma 2$ EH1
(SEQ ID NO: 180)

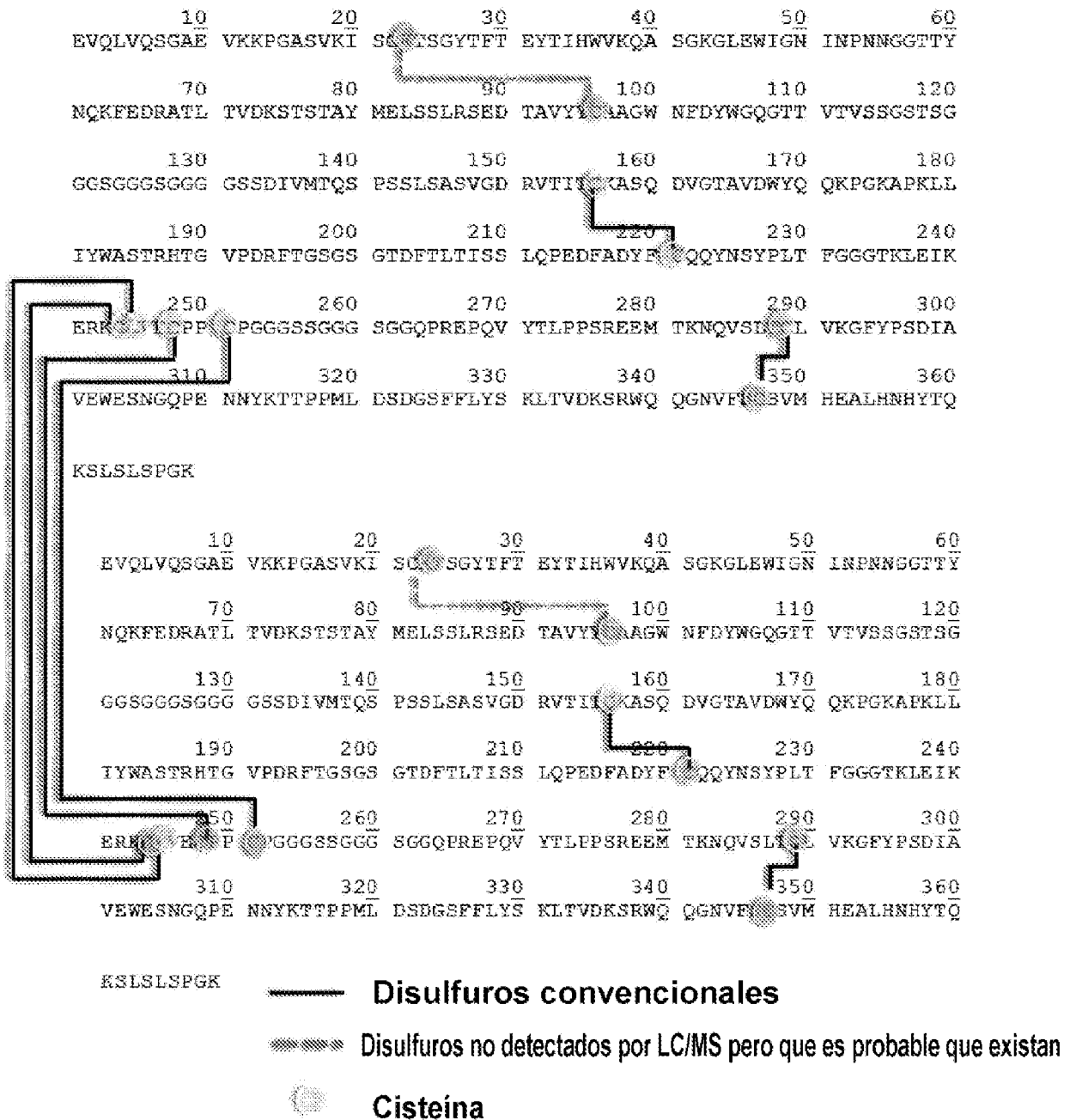


FIG. 10

Análisis de masas intactas de IAB22M γ2 EH1

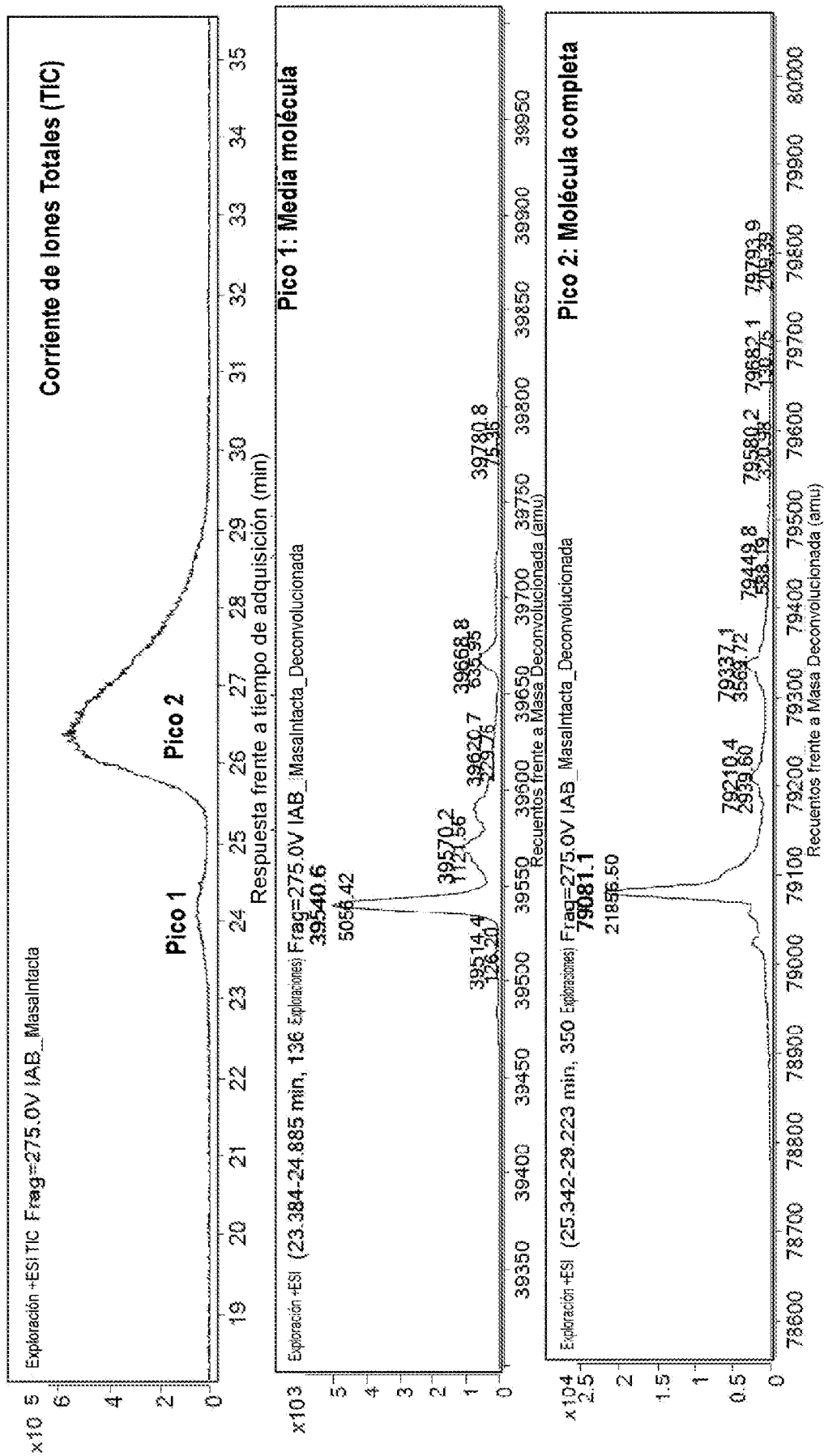


FIG. 14A

IAB22M γ 2 EH1 (de N- a C-terminal)

secuencia ligera variable (VL) anti-CD8
 DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRTSRISQYLAWYQQKPKVPKLLYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
 SLPEDVATYYCQQHNENPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Conector
 GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

secuencia pesada variable (VH) anti-CD8
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHFVROAPGKGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQGKATISADTSK
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGYGVYFDHWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 16)

Bisagra completa (EH1)
 ERKCCVECPPCPGGGSSGGSG (SEQ ID NO: 32)

Bisagra superior
 ERK (SEQ ID NO: 47)

Bisagra central
 CCVECPPCP (SEQ ID NO: 55)

Bisagra inferior
 GGGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG2 humana
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMMLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

FIG. 14B

Análisis de masas intactas de IAB22 γ2 EH2

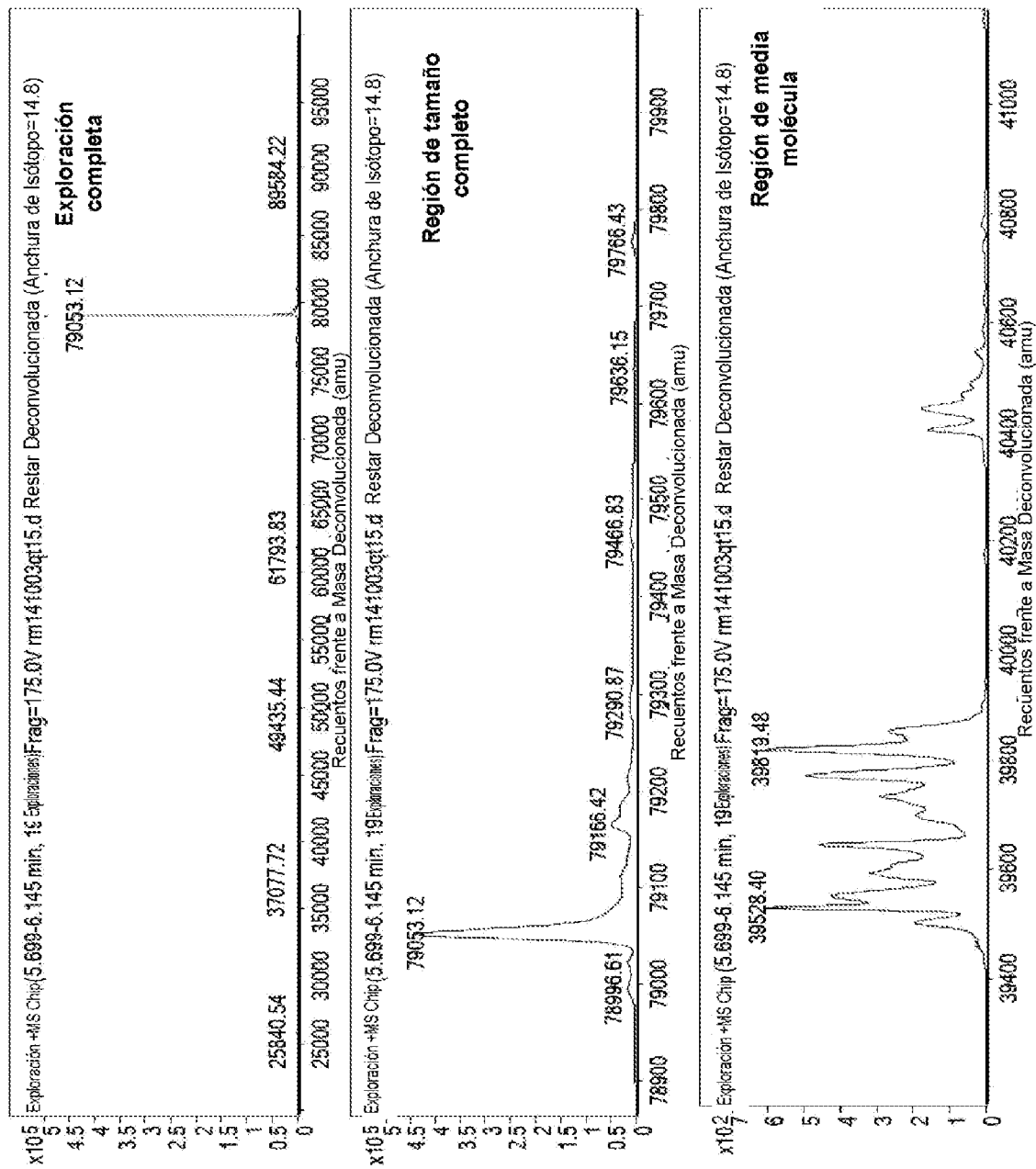


FIG. 15A

IAB22M γ 2 EH2 (de N- a C-terminal)

secuencia ligera variable (VL) anti-CD8

DVQITQSPSSLSASVGDRTTTCRTSRISQYLAWYQQKPGKVPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFT
LTISSLQPEDVATYYCQQHNENPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Conector

GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

secuencia pesada variable (VH) anti-CD8

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHFVRQAPGKGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQGKATISA
DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGYGVVFDHWGQGTLTVTSS (SEQ ID NO: 16)

Bisagra completa (EH2)

ERKSCVECPPCPGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 34)

Bisagra superior

ERK (SEQ ID NO: 47)

Bisagra central

SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)

Bisagra inferior

GGSSGGGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG2 humana

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMILDSGFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

FIG. 15B

IAB22M γ 1 EH1 (de N- a C-terminal)

secuencia ligera variable (VL) anti-CD8
DVQITQSPSSLASVGDRTITCRTSRISQYLAWYQQKPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGGSGTDFTLTISLQPE
DVATYYCQQHNENPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Conector

GSTSGGGGGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

secuencia pesada variable (VH) anti-CD8
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDTYIHFRQAPGKGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQKATISADTSKNTAY
LQMNSLRAEDTAVYYCGRGYYVFDHWGGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 16)

Bisagra completa (EH1)

EPKSCDKTHTCPPCGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 22)

Bisagra superior

EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 45)

Bisagra central

CPPC (SEQ ID NO: 50)

Bisagra inferior

GGSGGGGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)

GQPREQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)

GQPREQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 16B

IAB22M γ 2 NH1 (de N- a C-terminal)

secuencia ligera variable (VL) anti-CD8
 DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRTSRISQYLAWYQQKPKVPLLKLLYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
 QPEDVATYYCQQHNENPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Conector
 GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

secuencia pesada variable (VH) anti-CD8
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDTYIHFVRQAPGKGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQGKATISADTSKN
 TAYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGYGYVFDHWGQGLTVSS (SEQ ID NO: 16)

Bisagra completa (NH1)
 ERKCCVECPPCAPPVAGP (SEQ ID NO: 31)

Bisagra superior
 ERK (SEQ ID NO: 47)

Bisagra central
 CCVECPPCP (SEQ ID NO: 55)

Bisagra inferior
 APPVAGP (SEQ ID NO: 60)

CH3 de IgG2 humana
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

FIG. 16C

IAB22M γ 2 NH2 (de N- a C-terminal)

secuencia ligera variable (VL) anti-CD8
 DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRTSRISQYLAWYQQKPGKVPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
 SLPEDVATYYCQQHNENPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Conector
 GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

secuencia pesada variable (VH) anti-CD8
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFNIKDTYIHFVRQAPGKGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQGKATISADTSK
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGYGVYVFDHWGQGLTVSS (SEQ ID NO: 16)

Bisagra completa (NH2)
 ERKSCVECPPCPAPPVAGP (SEQ ID NO: 33)

Bisagra superior
 ERK (SEQ ID NO: 47)

Bisagra central
 SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)

Bisagra inferior
 APPVAGP (SEQ ID NO: 60)

CH3 de IgG21 humana
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

FIG. 16D

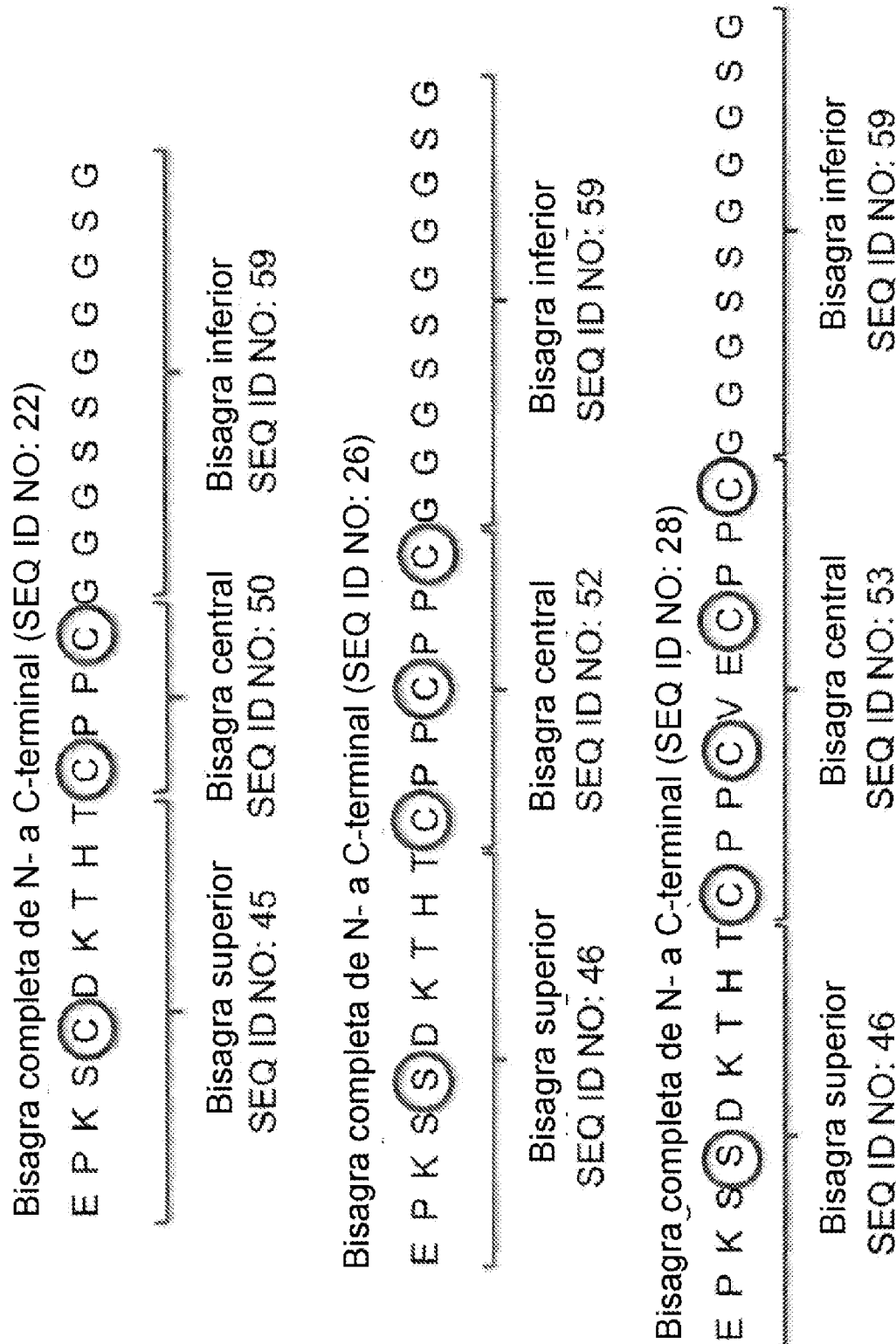


FIG. 19

IAB2M: Porcentaje de media molecula por análisis de masas intactas

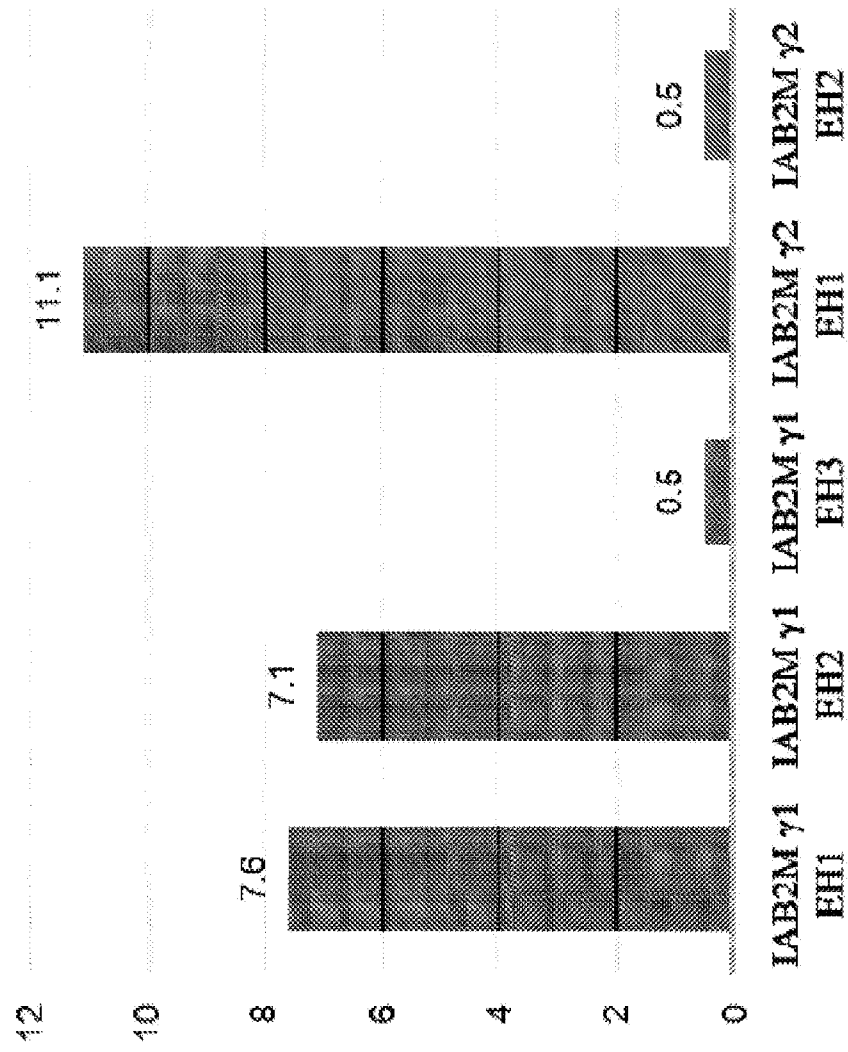


FIG. 20A

IAB22M: Porcentaje de media molécula por análisis de masas intactas

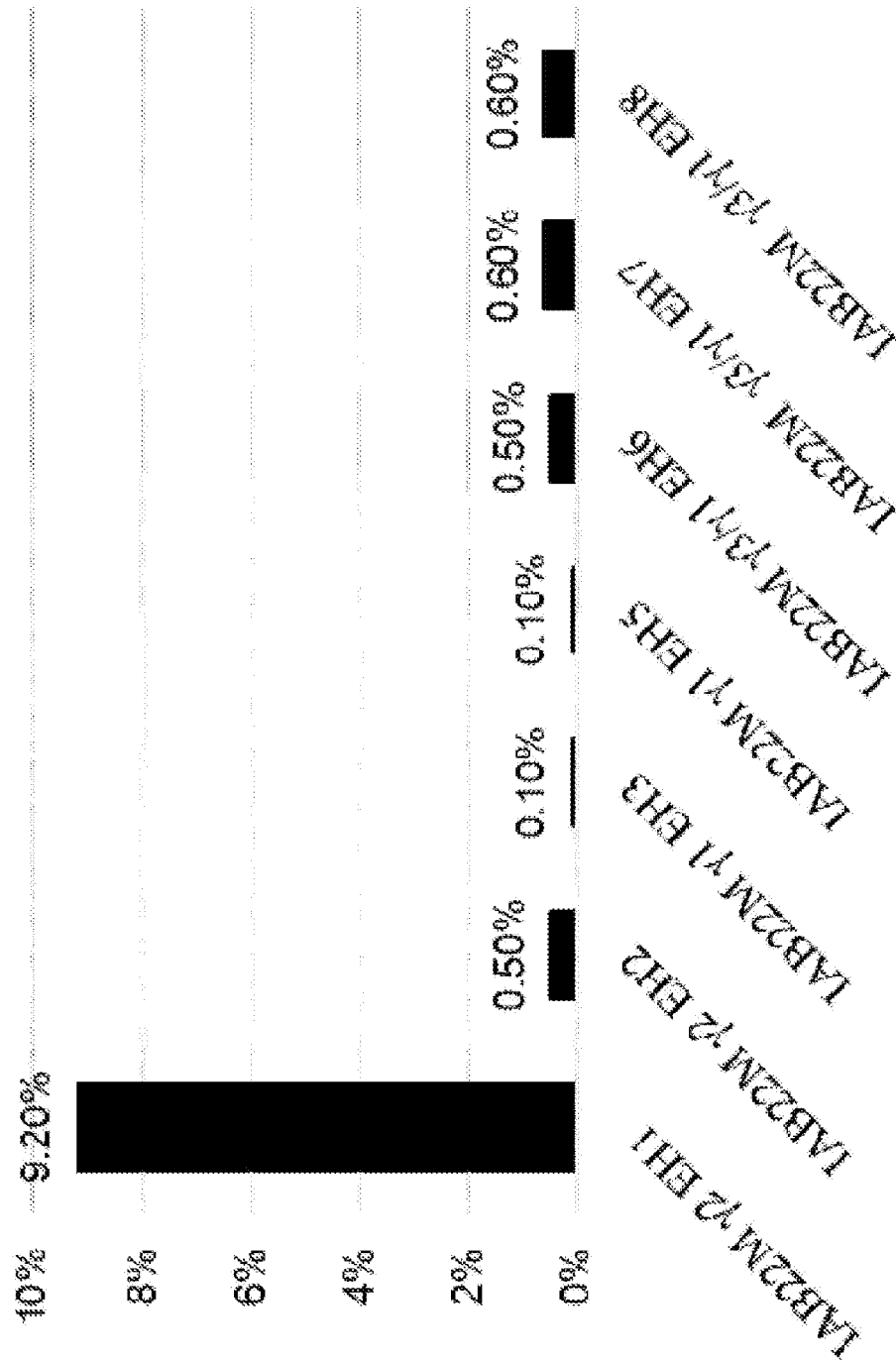


FIG. 20B

IAB22M γ 1 EH3 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-CD8
 DVQITQSPSSLSASVGDRTTTCRTSRISQYLAWYQQKPGKVPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLOPED
 VATYYCQQHNENPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Conector
 GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-CD8
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHFVRQAPGKGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQGKATISADTSKNTAYLQ
 MNSLRAEDTAVYYCGRGYGYVFDHWGGGTLVTSS (SEQ ID NO: 16)

Bisagra completa (EH3)
 EPKSSDKTHTCPPCPGCGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 26)

Bisagra superior
 EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)

Bisagra central
 CPPCPPC (SEQ ID NO: 52)

Bisagra inferior
 GGGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMIHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMIHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 20C

IAB22M γ 1 EH5 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-CD8
DVQITQSPSSLASVGDRTITCRTSRISQYLAWYQQKPGKPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLOPEDV
ATYYCQQHNENPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Conector
GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-CD8
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDTYIHFRQAPGKGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQGKATISADTSKNTAYLQ
MNSLRAEDTAVYYCGRGYGYVFDHWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 16)

Bisagra completa (EH5)
EPKSSDKTHTCPPCPPCGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 30)

Bisagra superior
EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)

Bisagra central
CPPCPPCPPC (SEQ ID NO: 54)

Bisagra inferior
GGSGGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)
GQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 20D

IAB22M $\gamma 3/\gamma 1$ EH6 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-CD8
 DVQITQSPSSLASVGDRTTTCRTSRISQYLAWYQQKPKGVKLLIYSGSTLQSGVPSRFRSGSGGTDFTLTISLQPE
 DVATYYCQQHNENPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Conector

GSTSGGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-CD8

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHFVRQAPGKGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQGKATISADTSKNTAYL
 QMNSLRAEDTAVYYCGRGYGYVFDHWGGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 16)

Bisagra completa (EH6)

ELKTPLGDTTHTCVCPPCGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 35)

Bisagra superior

ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)

Bisagra central

CVECPPC (SEQ ID NO: 57)

Bisagra inferior

GGGSGGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)

GQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 20E

IAB22M $\gamma 3/\gamma 1$ EH7 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-CD8

DVQITQSPSSLSASVGDRTTTCRTSRISQYLAWYQOKPKVKLLIYSGSTLQSGVPSRFRSGSGGTDFTLTISLQPE
DVATYYCQQHNEPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Conector

GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-CD8

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHFVRQAPGKGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQKATISADTSKNTAY
LQMNSLRAEDTAVYCGRGYGYVFDHWGGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 16)

Bisagra completa (EH7)

ELKTPGLGDTTHTCPPCPGSGGGSGGSG (SEQ ID NO: 36)

Bisagra superior

ELKTPGLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)

Bisagra central

CPPCPPC (SEQ ID NO: 52)

Bisagra inferior

GGSGGGSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 20F

IAB22M $\gamma 3/\gamma 1$ EH8 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-CD8
DVQITQSPSSLSASVGDRTTTCRTSRISQYLAWYQQKPGKPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
VATYYCQQHNENPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Conector
GSTSGGGGGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-CD8
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHFVRQAPGKGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQGKATISADTSKNTAYLQ
MNSLRAEDTAVYYCGRGYGYVFDHWGGGTLTVSS (SEQ ID NO: 16)

Bisagra completa (EH8)
ELKTPLGDTTHTCPPCPPPCPGGGSSGGSG (SEQ ID NO: 37)

Bisagra superior
ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)

Bisagra central
CPPCPPPCPPC (SEQ ID NO: 54)

Bisagra inferior
GGSSGGGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)
GOPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)
GOPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 20G

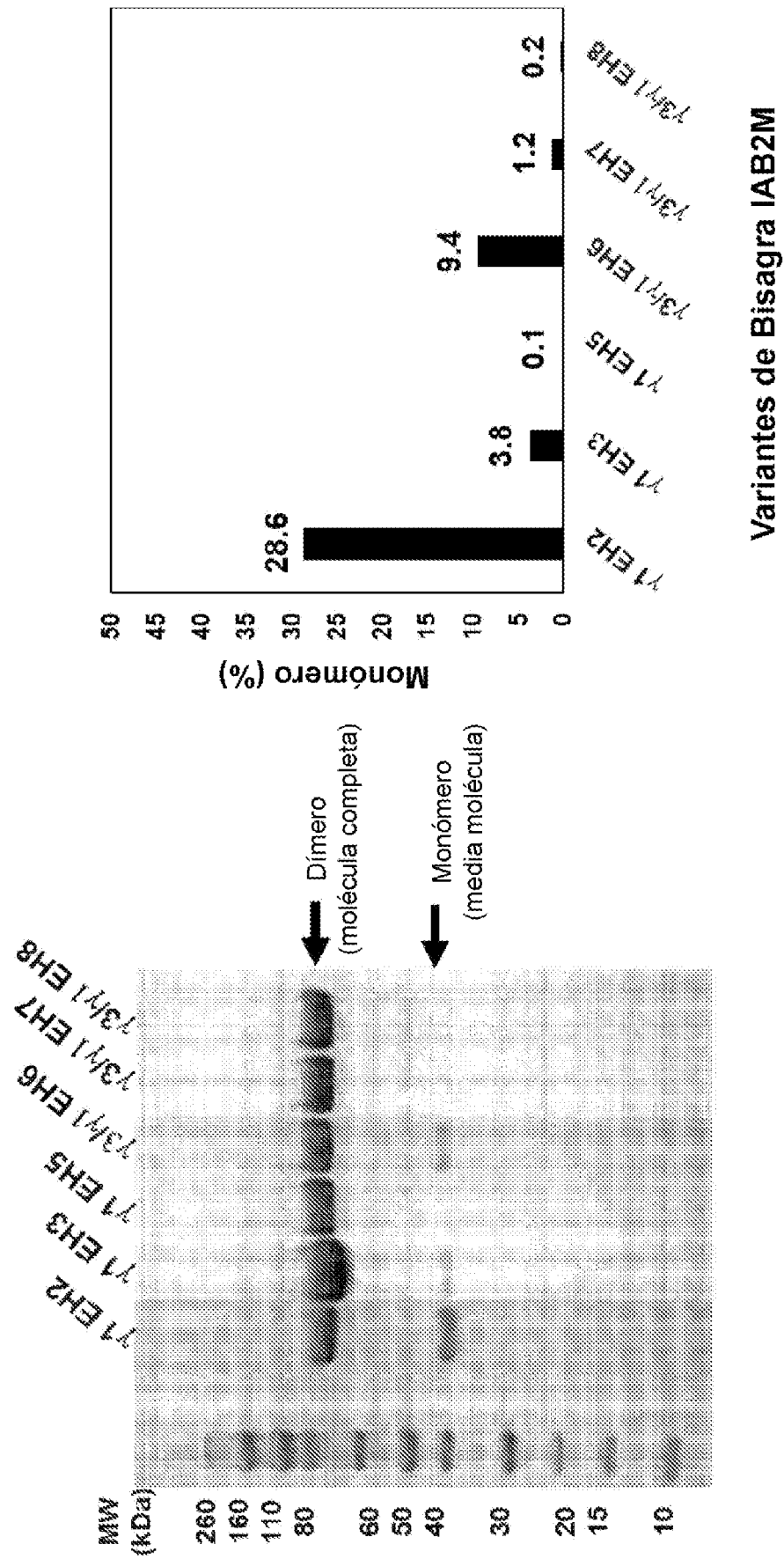


FIG. 21A

IAB2M γ 1 EH5 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-PSMA
DIVMTQSPSSLASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQOKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLSLOPE
DFADYFCQQNSYPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 13)

Conector
GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-PSMA
EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRATLTVDKSTSTAYM
ELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGGGTTTVSS (SEQ ID NO: 14)

Bisagra completa (EH5)
EPKSSDKTHTCPPCPGPGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 30)

Bisagra superior
EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)

Bisagra central
CPPCPPCP (SEQ ID NO: 54)

Bisagra inferior
GGSGGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMIHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)
GQPREPQVYTLPPSRDEMTKQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 21B

IAB2M $\gamma 3/\gamma 1$ EH6 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-PSMA
 DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLSLOPE
 DFADYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 13)

Conector
 GSTSGGGGGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-PSMA
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRATLTVDKSTSTAYM
 ELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTITVSS (SEQ ID NO: 14)

Bisagra completa (EH6)
 ELKTPLGDTTHTCVECPCPGGGSSGGSG (SEQ ID NO: 35)

Bisagra superior
 ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)

Bisagra central
 CVECPC (SEQ ID NO: 57)

Bisagra inferior
 GGGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 21C

IAB2M $\gamma 3/\gamma 1$ EH7 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-PSMA
 DIVMTQSPSSLSASVGDRTVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQPEDF
 ADYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 13)

Conector
 GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-PSMA
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRATLTVDKSTSTAYMEL
 SSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGGGTTVTSS (SEQ ID NO: 14)

Bisagra completa (EH7)
 ELKTPGLDTHTCPPPCGGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 36)

Bisagra superior
 ELKTPGLDTHHT (SEQ ID NO: 48)

Bisagra central
 CPPCPPC (SEQ ID NO: 52)

Bisagra inferior
 GGGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 21D

IAB2M $\gamma 3/\gamma 1$ EH8 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-PSMA

DIVMTQSPSSLSASVGDRTVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISL
QPEDFADYFCQQNSYPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 13)

Conector

GSTSGGGGGSGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-PSMA

EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRATLTVDKSTST
AYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGGGTTVTSS (SEQ ID NO: 14)

Bisagra completa (EH8)

ELKTPLGDTTHTCPPCPPCGGGSSGGSG (SEQ ID NO: 37)

Bisagra superior

ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)

Bisagra central

CPPCPPCPPC (SEQ ID NO: 54)

Bisagra inferior

GGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)

GQPREQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)

GQPREQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 21E

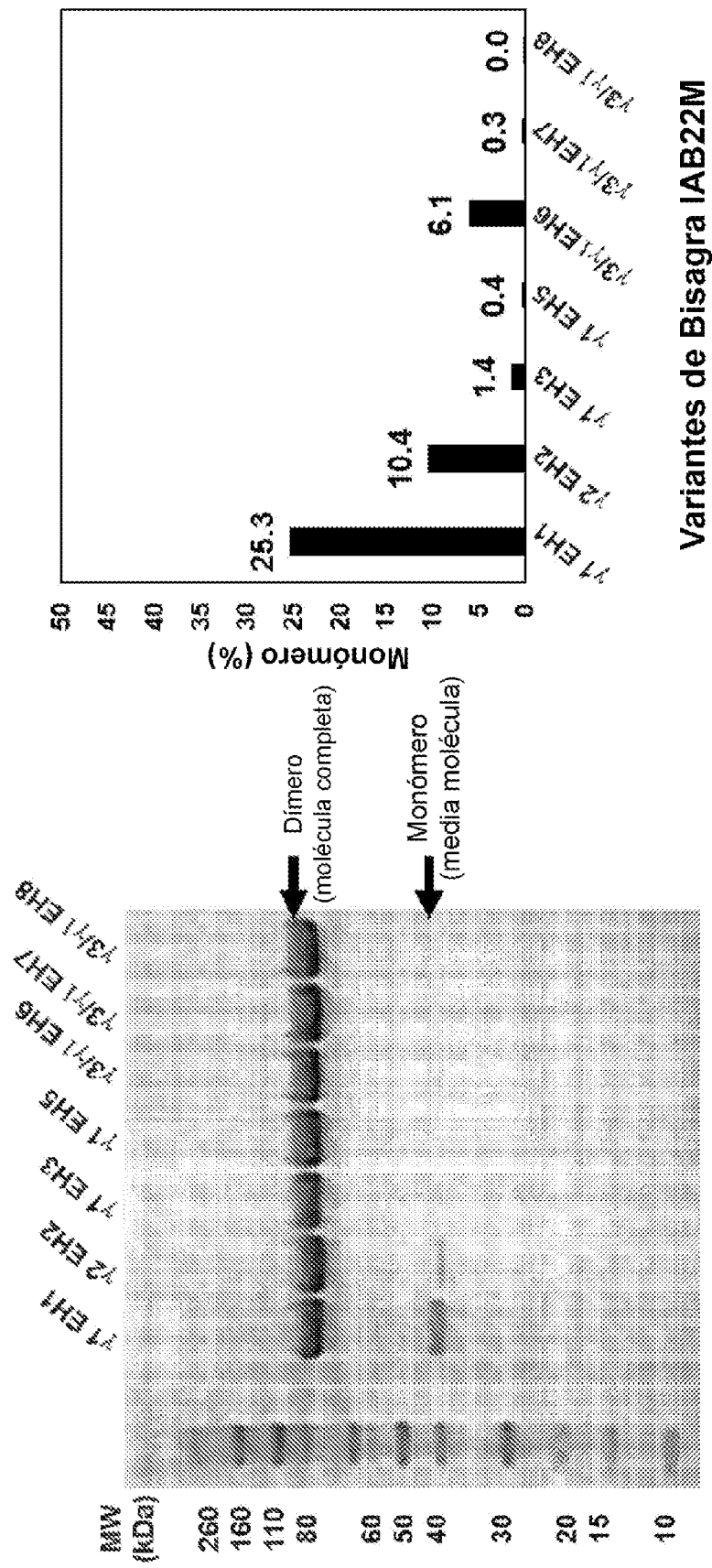


FIG. 22A

IAB22M γ 1 EH2 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-CD8

DVQITQSPSSLSASVGDRTTTCRTSRISQYLAWYQQKPKVKKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLOPEDVATYCCQHNENPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Conector

GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-CD8

EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDTYIHFVROAPGKGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQKATISADT
SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGYYVFDHWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 16)

Bisagra completa (EH2)

EPKSSDKTHTCPPCGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 24)

Bisagra superior

EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)

Bisagra central

CPPC (SEQ ID NO: 50)

Bisagra inferior

GGSGGGSGG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 22B

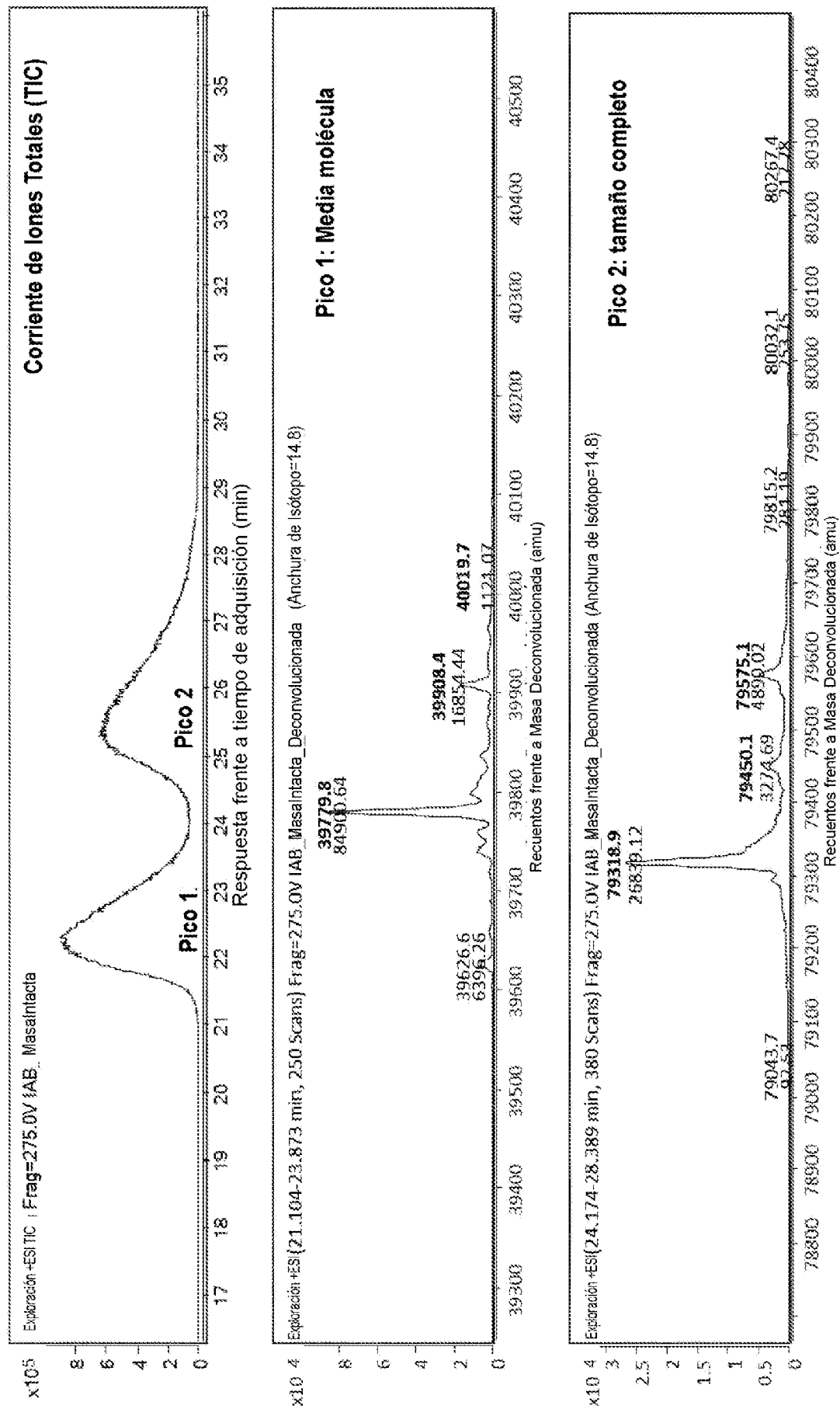
Análisis de masas intactas de IAB22M γ 1 EH1

FIG. 23

Análisis de masas intactas de IAB22M γ 1 EH3

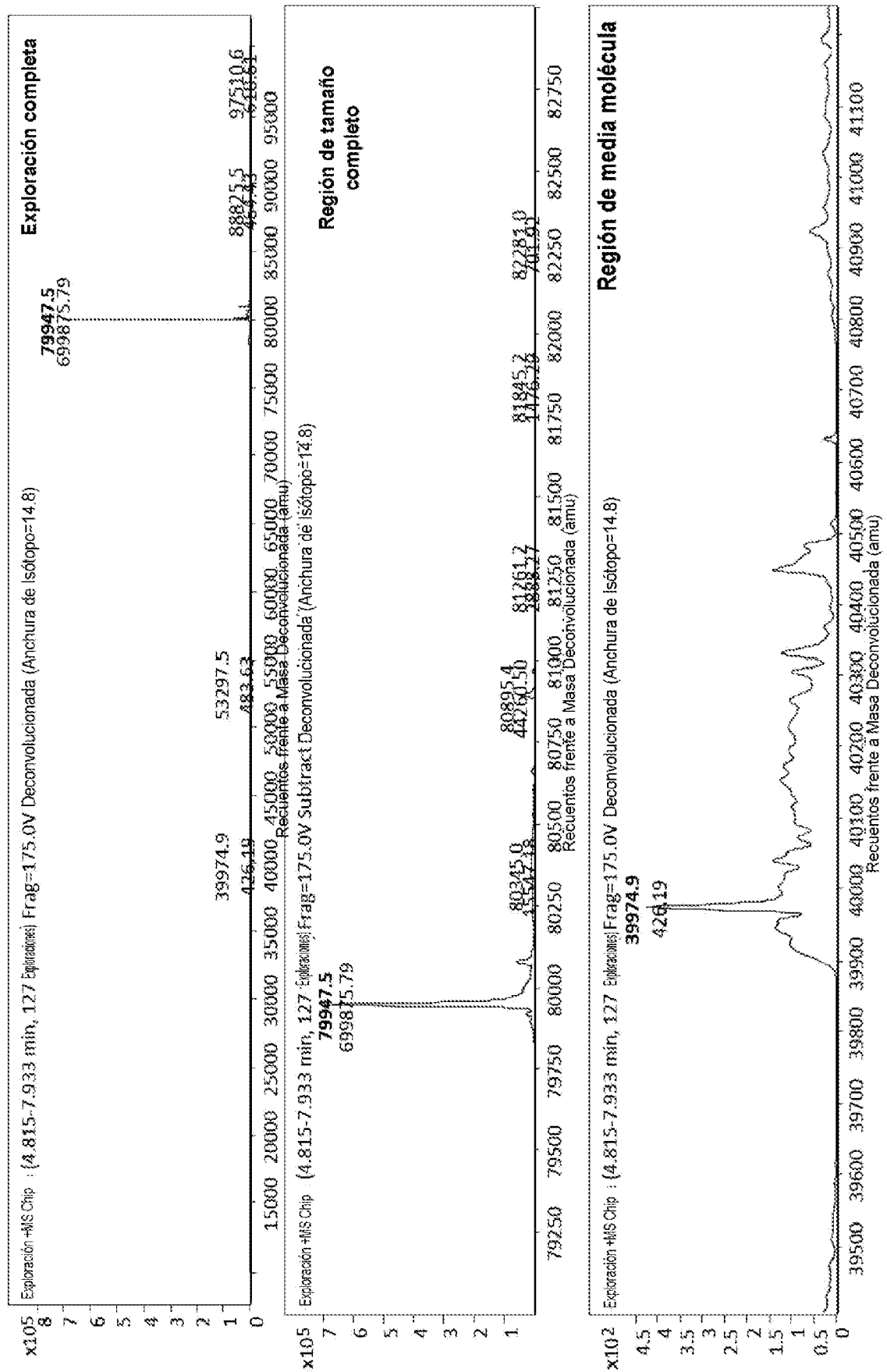


FIG. 24

Análisis de masas intactas de IAB22M γ 2 EH1

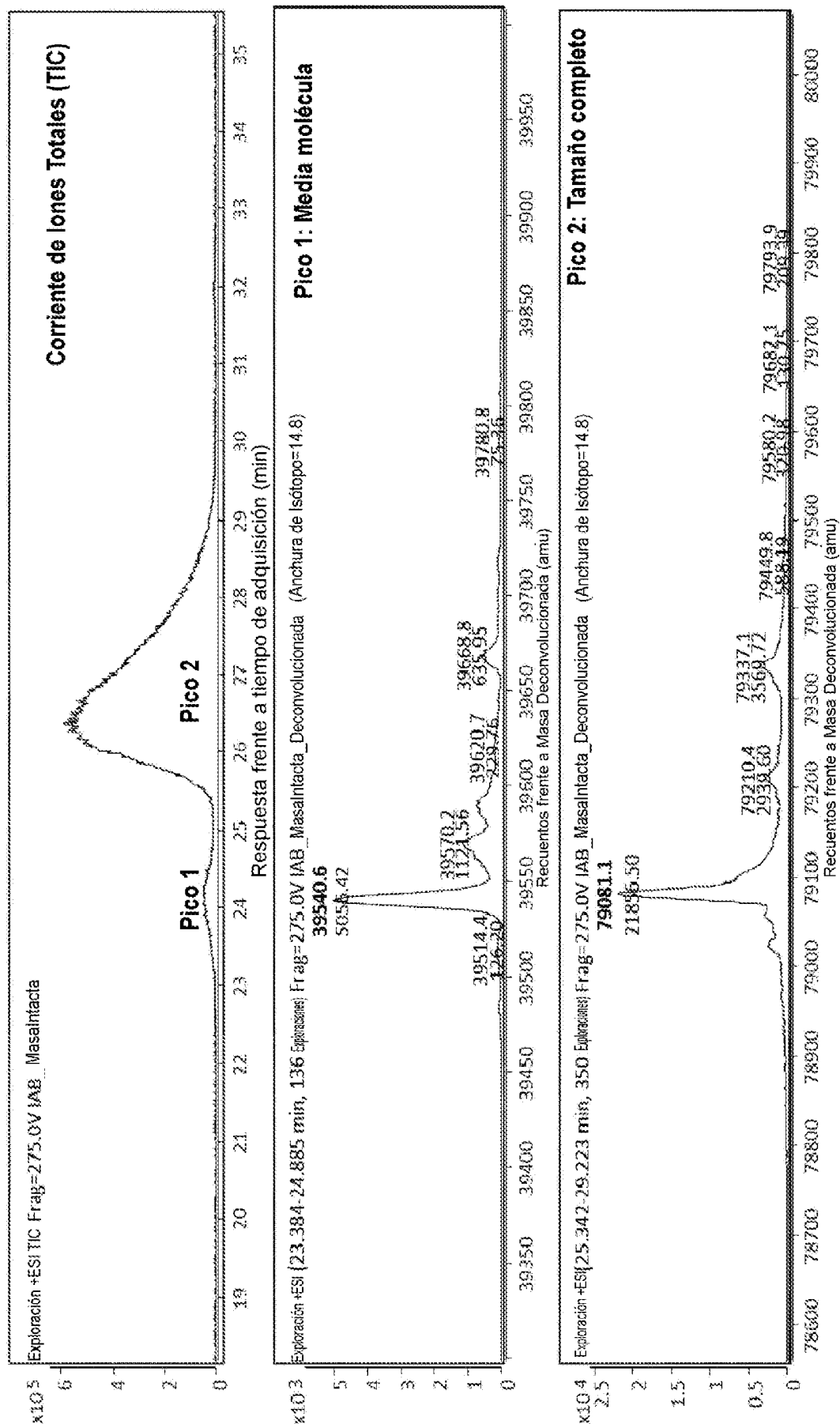


FIG. 25A

Análisis de masas intactas de IAB22M γ 2 EH2

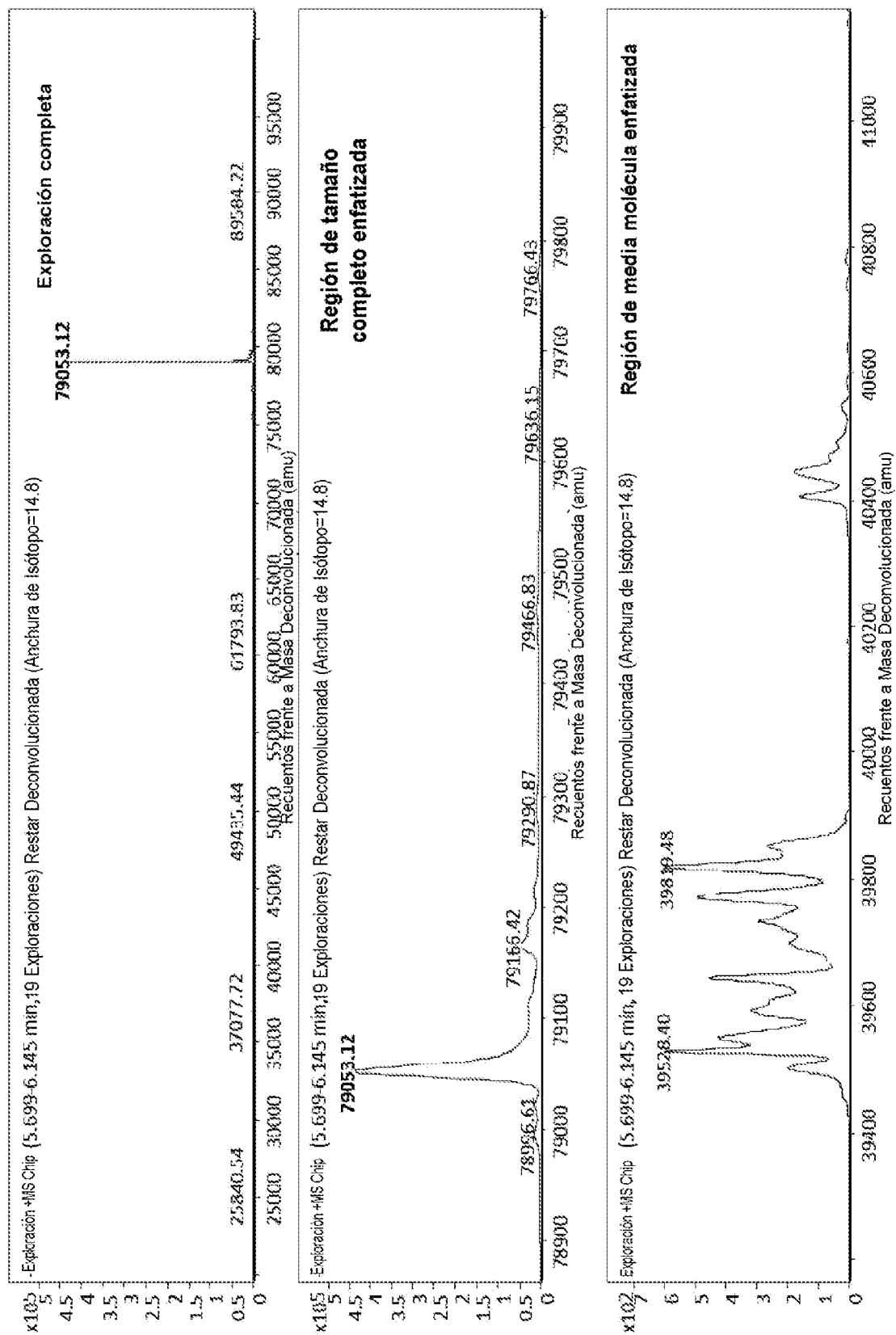


FIG. 25B

Variantes de Bisagra IAB2M que se unen a células C4-2 XCL

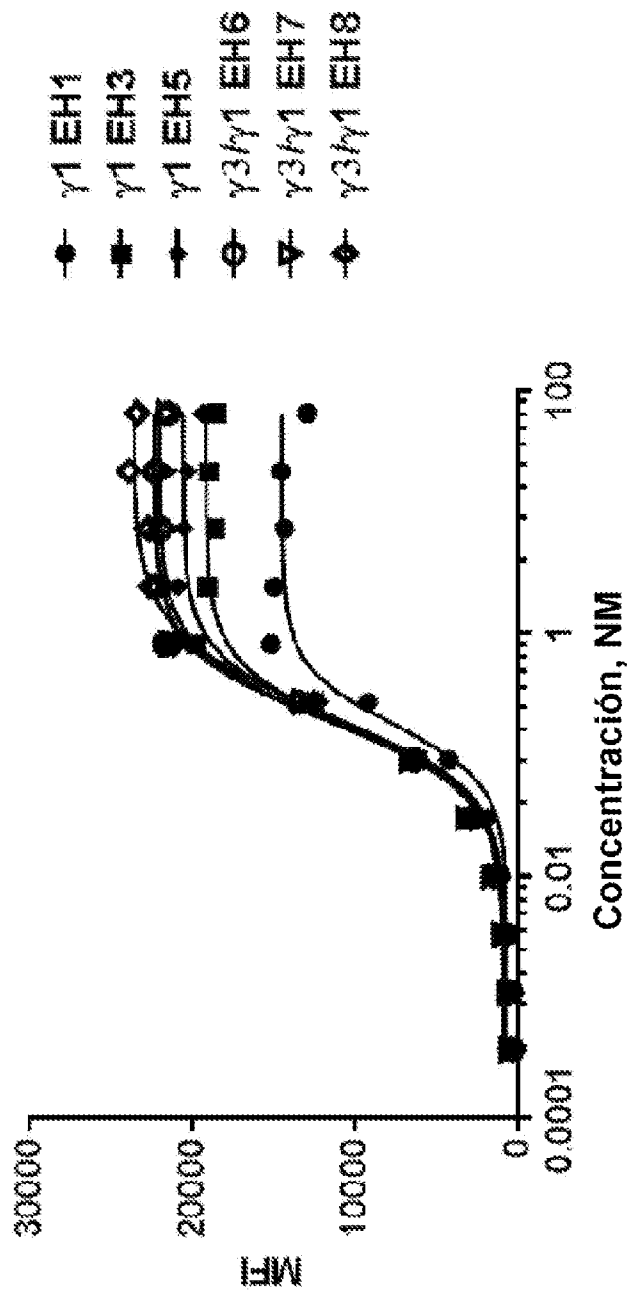


FIG. 26

Variantes de Bisagra IAB22M que se unen a células HPB-ALL

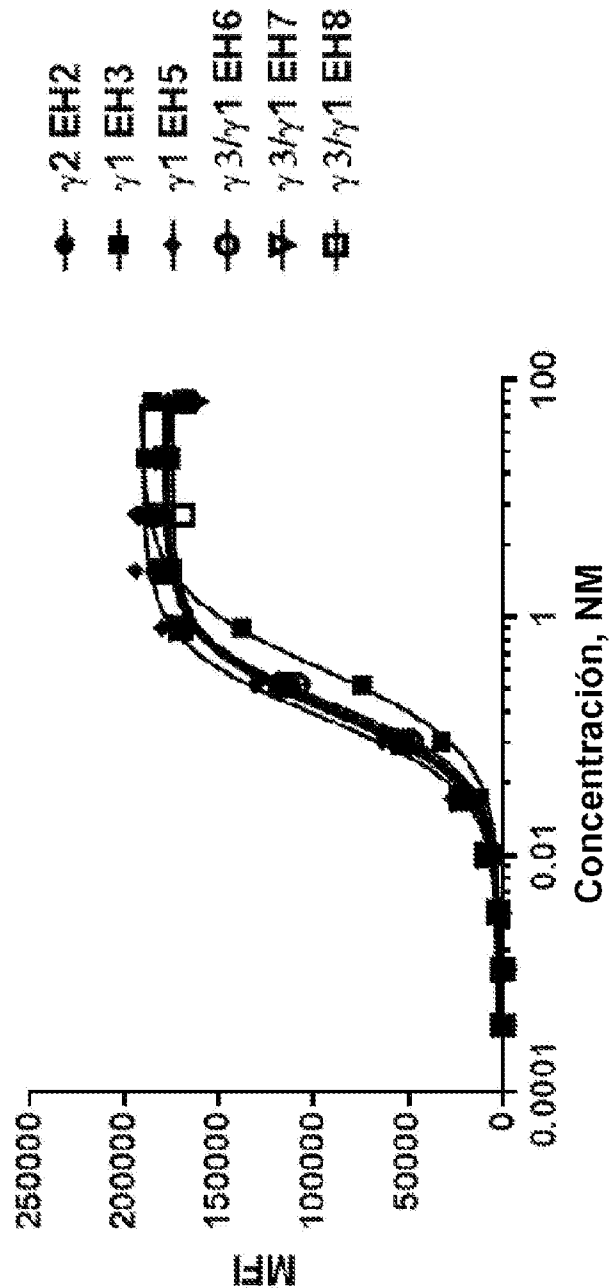


FIG. 27

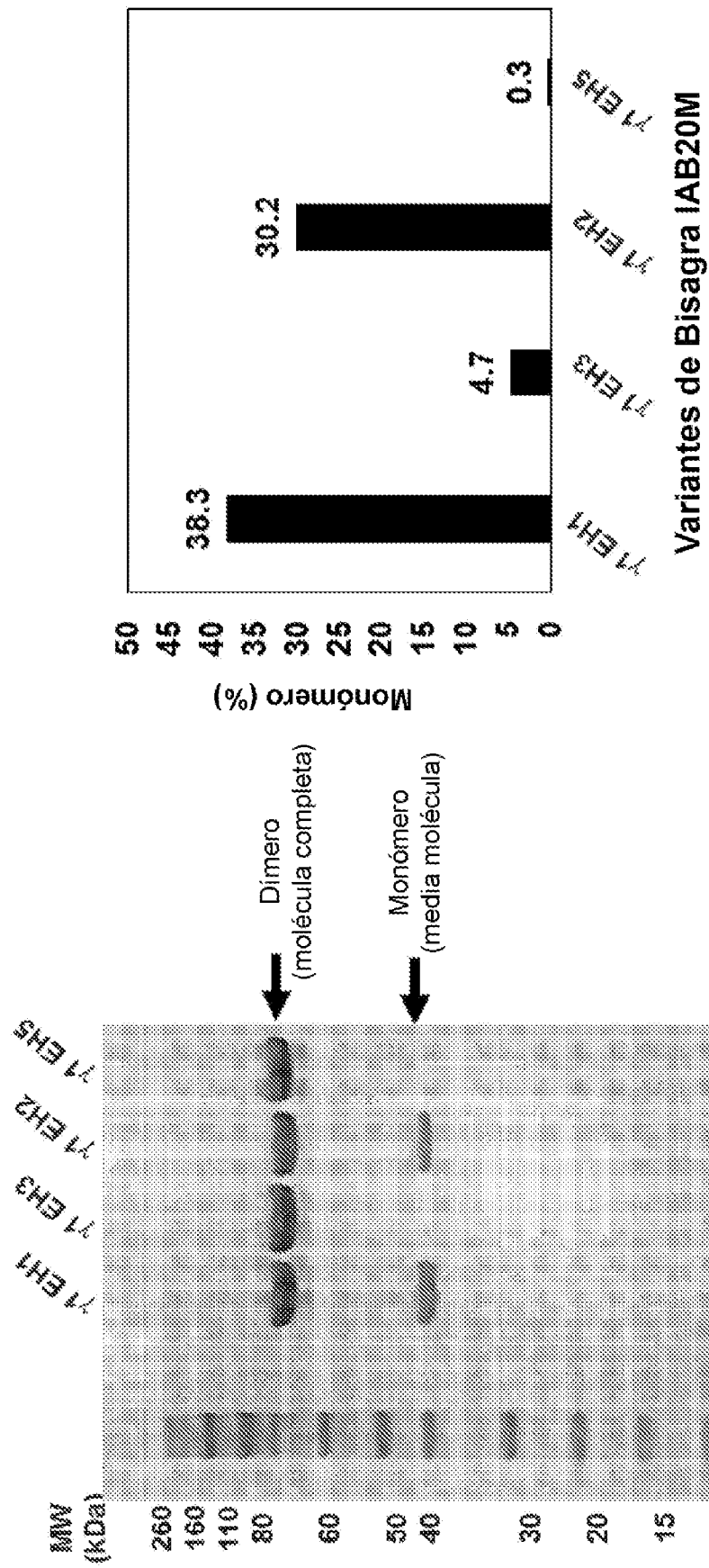


FIG. 28A

IAB20M γ 1 EH1 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-5T4
 DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVNDVAWYQQKPGQAPRLLISYTSSRYAGVPDRFSGSGGTDFLTITSSLQ
 AEDVAVYYCQDYNPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 17)

Conector
 GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-5T4
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYMHVWRQAPGQGLEWIGRINPNNGVTLYNQKFKDRVTMTVDTSIS
 TAYMELSRRLRSDDTAVYYCARSTMITNMYMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 18)

Bisagra completa (EH1)
 EPKSCDKTHTCPPCGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 22)

Bisagra superior
 EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 45)

Bisagra central
 CPPC (SEQ ID NO: 50)

Bisagra inferior
 GGGSGGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 28B

IAB20M γ 1 EH3 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-5T4
 DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVNDVAWYQQKPGQAPRLLISYTSSRYAGVPDRFSGSGGTDFLTITSSLOA
 EDVAVYYCQQDYNSPPTFGQGKVEIK (SEQ ID NO: 17)

Conector

GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-5T4

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYMHVVRQAPGQGLEWIGRINPNNGVTLYNQKFKDRVTMTVDTSIST
 AYMELSRRLRSDDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 18)

Bisagra completa (EH3)

EPKSSDKTHTCPPCPGSGGGSG (SEQ ID NO: 26)

Bisagra superior

EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)

Bisagra central

CPPCPPC (SEQ ID NO: 52)

Bisagra inferior

GGSGGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)

GQPREQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMIHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)

GQPREQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMIHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 28C

IAB20M γ 1 EH2 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-5T4

DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCCKASQSVNDVAWYQQKPKGQAPRLISYTSSRYAGVPDRFSGSGGTDFTLTITISLQA
EDVAVYYCQQDYNSPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 17)

Conector

GSTSGGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-5T4

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYMHVVRQAPGQGLEWIGRINPNNGVTLYNQKFKDRVTMTVDTSIST
AYMELSLRSDDTAVYYCARSTMITNYMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 18)

Bisagra completa (EH2)

EPKSSDKTHTCPPCGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 24)

Bisagra superior

EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)

Bisagra central

CPPC (SEQ ID NO: 50)

Bisagra inferior

GGGSGGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)

GQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 28D

IAB20M γ 1 EH5 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-5T4
DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVNDVAWYQQKPGQAPRLLISYTSSRYAGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE
DVAVYYCQQDYNPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 17)

Conector
GSTSGGGGGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-5T4
QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYSFTGYMHWVRQAPGQGLEWIGRINPNNGVTLYNQKFKDRVTMTVDTSISTA
YMELSRLRSDDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 18)

Bisagra completa (EH5)
EPKSSDKTHTCPCPPCPPCGGGSSGGSG (SEQ ID NO: 30)

Bisagra superior
EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)

Bisagra central
CPPCPPCPC (SEQ ID NO: 54)

Bisagra inferior
GGSSGGGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 28E

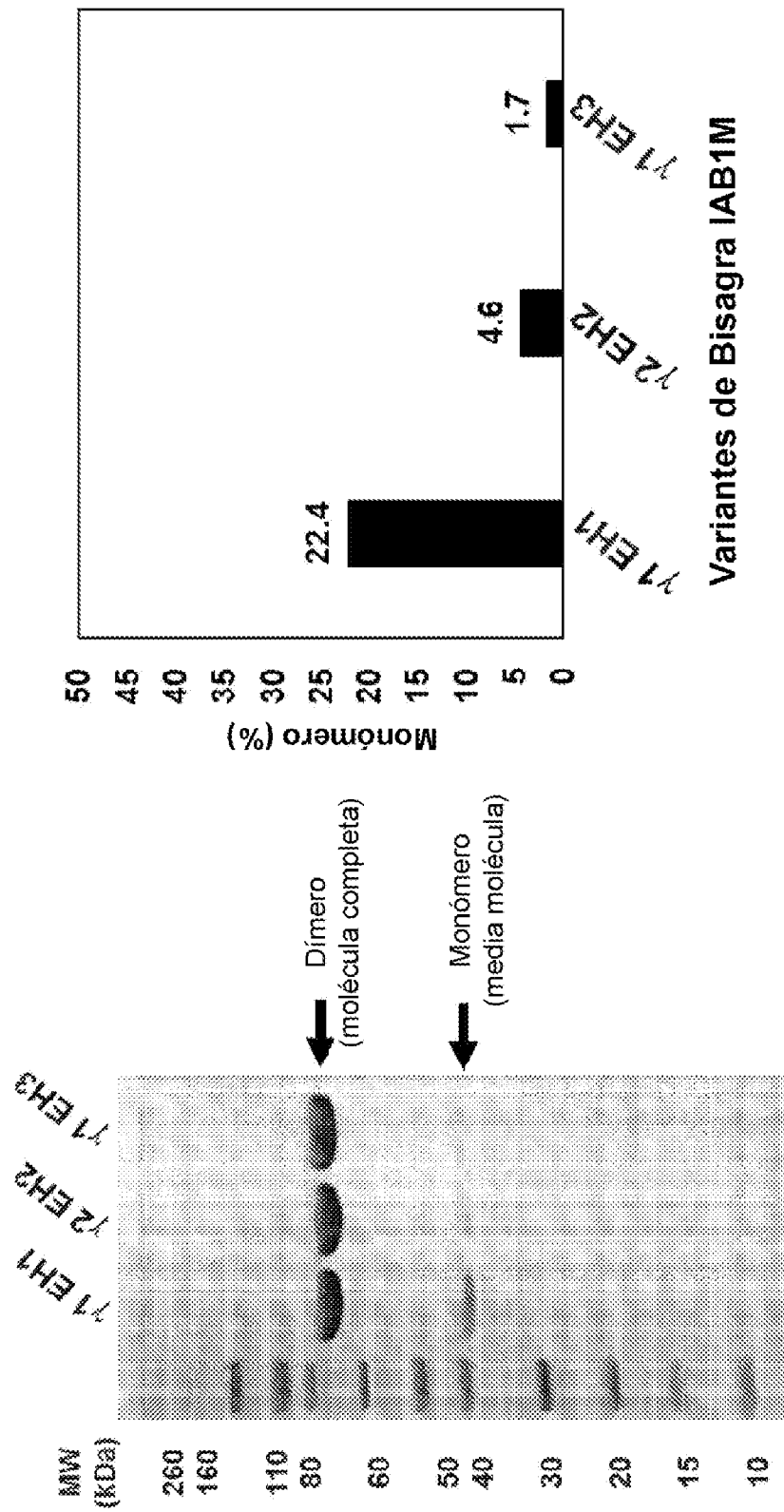


FIG. 29A

IAB1M γ 1 EH1 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-PSCA (A111)
 DIQLTQSPSTLSASVGDRTITCSASSSVRFHWHYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTSS
 LQPEDFATYYCQQWGSSPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 67)

Conector
 GSTSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-PSCA (A11)
 EVQLVEYGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMNIKDYYIHVVRQAPGKGLEWVAWIDPENGDTFVPKFQGRATMSAD
 TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCKTGGFWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 68)

Bisagra_completa (EH1)
 EPKSCDKTHTCPPCGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 22)

Bisagra superior
 EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 45)

Bisagra central
 CPPC (SEQ ID NO: 50)

Bisagra inferior
 GGGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)
 GQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 29B

IAB1M γ 2 EH2 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-PSCA (A11)
 DIQLTQSPSTLSASVGDRTTITCSASSVRFHWHYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
 SSLQPEDFATYYCQQWGGSSPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 67)

Conector
 GSTSGGGGGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-PSCA (A11)
 EVQLVEYGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDYIHWVRQAPGKGLEWVAWIDPENGDTFVFPKQGRATMS
 ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCKTGGFWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 68)

Bisagra completa (EH2)
 ERKSCVECPPCPGGGSSGGSG (SEQ ID NO: 34)

Bisagra superior
 ERK (SEQ ID NO: 47)

Bisagra central
 SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)

Bisagra inferior
 GGGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG2 humana
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

FIG. 29C

IAB1M γ 1 EH3 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-PSCA (A11)
 DIQLTQSPSTLSASVGDRTITCSASSVRFIHWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
 SLQPEDFATYYCQWGGSSPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 67)

Conector
 GSTSGGGGGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-PSCA (A11)
 EVQLVEYGGGLVQPGGSLRLSCAASG¹FN²IKDY³Y⁴IHWV⁵RQAPGKGL⁶EW⁷AWIDPENGDT⁸EFV⁹PKFQGRATMSA
 DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY¹⁰CKTGGFWGQGLTV¹¹VSS (SEQ ID NO: 68)

Bisagra completa (EH3)
 EPKSSDKTHTCPPCPGGGGSSGGSG (SEQ ID NO: 26)

Bisagra superior
 EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)

Bisagra central
 CPPCPPC (SEQ ID NO: 52)

Bisagra inferior
 GGGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)
 GOPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)
 GOPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

FIG. 29D

IAB20M γ 2 EH2 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-5T4

DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVNDVAWYQQKPGQAPRLLISYTSRRYAGVPDFRFGSGSGTDFTLTIS
SLOAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 17)

Conector

GSTSGGGGGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-5T4

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYYMHWVROAPGQGLEWIGRINPNNGVTLYNQKFKDRVTMTVD
TSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARSTMITNYMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 18)

Bisagra completa (EH2)

ERKSCVECPPCPGGGSSGGSG (SEQ ID NO: 34)

Bisagra superior

ERK (SEQ ID NO: 47)

Bisagra central

SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)

Bisagra inferior

GGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG2 humana

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSGFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

FIG. 32

IAB25M γ 2 EH2 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-CD3
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMNWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGVPAHFGRSGSGTDFTLT
 SSLEPEDFAVYCOQWSSNPFTFGQGKVEIK (SEQ ID NO: 19)

Conector
 GSTSGGGGGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-CD3
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYTMHWVVRQAPGQGLEWMGYINPSRGYTNYNQKFKDRVTM
 TTDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYCYCARYDDHYSLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 20)

Bisagra completa (EH2)
 ERKSCVECPGPGGGSSGGSG (SEQ ID NO: 34)

Bisagra superior
 ERK (SEQ ID NO: 47)

Bisagra central
 SCVECPGPG (SEQ ID NO: 56)

Bisagra inferior
 GGGSSGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG2 humana
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

FIG. 33

M1 = VL – VH
M2 = VH - VL

IAB2M γ 1 EH3 (M1) (SEQ ID NO: 162)

gatattgtgatgacccagagcccgagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc
 attacctgcaaaagcagcaggatgtggcacccgcgtggattgggtatcagcagaaaccg
 ggcaaaagccgaaactgctgatttattgggcgagcaccccataccggcgtgccggat
 cgctttaccggcagcggcagcggcacccgattttaccctgaccattagcagcctgcagccg
 gaagattttgcggattattttgccagcagataaacagctatccgctgacctttggcggc
 ggcaccaaactggaaattaaaggcagcacccagcggcggcagcggcggcagcggc
 ggcggcggcagcagcgaagtgcagctggtgcagagcggcggcgaagtgaaaaaaccgggc
 gcgagcgtgaaaaattagctgcaaaaccagcggctatacctttaccgaatataccattcat
 tgggtgaaacagcggcagcggcgaaggcctggaatggattggcaacattaacccgaacaa
 ggccgacacacctataaacacagaaatttgaagatcgcgcgacccctgacctggataaaagc
 accagcaccgcgtatatggaaactggaactgagcagcctgcgcagcgaagataccgcgtgtattat
 tgcgcggcggctggaaactttgattatttggggccaggcaccaccctgacctgagcagc
 gaaccgaaaagcagcgataaaaaccataacctgcccgccgtgcccgccgtggcggcggc
 agcagcggcggcggcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 agccgcgaagaaatgaccaaataaccaggctgagcctgacctgcctggtgaaaggctttat
 ccgagcgatatgcgggtggaatgggaaagcaacggccagccggaaacaaactataaaacc
 accccgcggctgctggatagcgatggcagctttttctgtatagcaaaactgacctggat
 aaaagccgctggcagcagggcaacgtgttagctgcagcgtgatgcataagcgcgtgcata
 aaccattatacccaaaaaagcctgagcctgagcccgccg (SEQ ID NO: 162)

FIG. 34A

IAB2M γ 1 EH5 (M1) (SEQ ID NO: 163)

gatattgtgatgacccagagcccgagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc
 attacctgcaaagcgagcagcaggatgtgggcaccgcggtggattgggtatcagcagaaaccg
 ggcaaagcgcgaaactgctgatttattgggcgagcaccgccataccggcgtgccgat
 cgcttacccggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctgcagccg
 gaagattttgcggattattttgccagcagtataaacagctatccgctgacctttggcggc
 ggcacaaactggaaattaaaggcagcaccagcggcggcagcggcggcggcagcggc
 ggcggcggcagcagcgaagtgcagctggtgcagagcggcgggaagtgaataaacgggc
 gcgagcgtgaaattagctgcaaaaccagcggctatacctttaccgaatataccattcat
 tgggtgaaacagcggcagcggcgaaggcctgggaatggattggcaacattaaaccgaacaac
 ggcgcacccacctataaccagaaatttgaagatcgcgcgacccctgaccgtggataaaagc
 accagcacccgtatatggaaactgagcagcctgcgcagcgaagataccgcggtgtattat
 tgcgcggcggctggaacttgattattggggcagggcaccacccgtgaccgtgagcagc
 gaaccgaaagcagcgataaaaccataacctgcccgccgtgcccgccgtgcccgccgtgc
 ggcggcggcagcagcggcggcggcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 ctgccgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 ggcttttaccgagcgatatgcgggtggaatgggaaagcaacggccagccgggaaacaac
 tataaaaccaccccgcggtgctggatagcgatggcagcttttctgtatagcaactg
 accgtggataaaagccgctggcagcagggcaacgtgttagctgcagcgtgatgcatagaa
 gcgctgcataaacattatacccagaaaggcctgagcctgagcccgggc **(SEQ ID NO: 163)**

FIG. 34B

IAB2M γ 1 EH8 (M1) (SEQ ID NO: 164)

gatattgtgatgaccagagcccgagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc
 attacctgcaaaagcagcaggatgtgggcaccgcggtggattggtatcagcagaaaccg
 ggcaaaagcgcgaactgctgattattgggcgagcaccgccataccggcgtgccggat
 cgcttacccggcagcggcagcccgattttaccctgaccattagcagcctgcagccg
 gaagattttgcggattattttgccagcagtataacagctatccgctgacctttggcggc
 ggcaaccaactggaaattaaaggcagcaccagcggcggcagcggcggcggcagcggc
 ggcgcggcagcagcgaagtgcagctggtgcagagcggcggcgggaagtgaaaaaaccgggc
 gcgagcgtgaaaattagctgcaaaaccagcggctatacctttaccgaatataccattcat
 tgggtgaaacaggcgagcggcgaaggcctgggaatggattggcaacattaaaccgaaacaac
 ggcgccaccacctataaccagaaatttgaagatcgcgcgaccctgaccgtggataaaagc
 accagcacccgtatatggaaactgagcagcctgcgcagcgaagataccgcggtgtattat
 tgcgcggcggctggaaactttgattattggggccaggccaccacccgtgaccgtgagcagc
 gaactgaaaaaccccgctgggcgataaccaccatacctgcccgcctgcccgcctgcccgc
 ccgtgcggcggcggcagcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 tataccctgccgcggcggcgaagaaatgaccaaaccaggtgagcctgacccctgcctg
 gtgaaaggctttatccgagcgtatatgcgggtggaatgggaaagcaaccggccagccggaa
 aacaactataaaaccccccgcggctgctggatagcgatggcagcttttctgtatagc
 aaactgaccgtggataaaagccgcctggcagcagggcaacgtgttagctgcagcgtgatg
 catgaagcgcgtgcataaacattatacccagaaaagcctgagcctgagcccgggc **(SEQ ID NO: 164)**

FIG. 34C

IAB2M γ 1 EH3 (M2) (SEQ ID NO: 165)

gaagtgcagctggtgcagagcggcggaagtgaaaaaaccggcgagcgtgaaaatt
 agctgcaaaaccagcggctatacctttaccgaatataccattcattgggtgaaacagcg
 agcggcaaaaggcctggaatggattggcaacattaacccgaacaacggcgaccacctat
 aaccagaaatttgaagatcgcgcgaccctgaccgtggataaaagcaccagcacccgtat
 atggaactgagcagcctgcgcagcgaagataccgcgggtgtattattgcgcggcggctgg
 aacttgattattggggccaggcaccaccctgaccgtgagcagcggcagcaccagcggc
 ggcgagcggcgcgcgagcggcgcgcgcgcgcgagcagcagcagcagcagcagcagc
 ccgagcagcctgagcgcagcgtggcgagcgcgtgaccattacctgcaaaagcagccag
 gatgtggcacccgggtggattggtatcagcagaaaccgggcaaaagcggcaactgctg
 attattggcgagcaccgccataccggcgtccggatcgctttaccggcagcggcagc
 ggcaccgatttacccctgaccattagcagcctgcagccgggaagattttgcggattattt
 tgccagcagtataacagctatccgctgacctttggcgcgccaccacaaactggaaattaaa
 gaaccgaaaagcagcgataaaaaccatacctgcccgccgtgcccgccgtgcggcgggc
 agcagcggcgcgcgagcggcgccagcgcgcgaaccgcaggtgtataccctgccgcgg
 agccgcgaagaaatgaccaaaaaaccaaggtgagcctgacctgcctggtgaaaggctttat
 ccgagcgatatcgcggtggaatgggaaagcaacggccagccggaacaactataaaacc
 accccgccggtgctggatagcgatggcagcttttctgtatagcaaaactgaccgtggat
 aaaagccgctggcagcagggcaacgtgttagctgcagcgtgatgcataagcgcgtgc
 aaccattatacccagaaaagcctgagcctgagcccgccg (SEQ ID NO: 165)

FIG. 34D

(SEQ ID NO: 5)

FIG. 34E

IAB2M γ 1 EH8 (M2) (SEQ ID NO: 6)

gaagtgcagctggtgcagagcggcggaagtgaataaacggcgagcgtgaaatt
 agctgcaaaaccagcggtatacctttaccgaataataccattcattgggtgaaacaggcg
 agcggcaaaaggcctggaatggattggcaacatataccggaacaacggcgaccacctat
 aaccagaaattgaagatcgcgcgaccctgaccgtggataaaagcaccagcacgcgtat
 atggaactgagcagcctgcgcagcgaagataccgggtgtattattgcgcggcggtgg
 aacttgattattggggccagggcaccacccgtgaccgtgagcagcggcaccagcggc
 ggcgagcggcgcgagcggcgcgggcgggcgagcagcgatatgtgatgacccagago
 ccgagcagcctgagcgcgagcgtggcgatcgcgtgaccattacctgcaaaagcgagccag
 gatgtgggcaccgcggtggattgggtatcagcagaaacgggcaaaagcggcaactgctg
 atttattgggcagcacccgcataccggcgtgccggtcgcttacggcagcggcagc
 ggcaaccgattttaccctgaccattagcagcctgcagccgggaagattttgcggattattt
 tgccagcagtataacagctatccgctgacctttggcgggcgaccaaactggaaattaaa
 gaactgaaaaccccgctgggcgataaccacccatacctgcccgctgcccgctgcccg
 ccgtgcggcgggcgagcagcggcgggcgagcggcgccagccgcggaaccgcaggtg
 tataccctgccgcccagcgcgaagaaatgaccaaataaccaggtgagcctgacctgcctg
 gtgaaaggcttttatccgagcgatatcgcggtggaatgggaaagcaacggccagccggaa
 acaactataaaaccaccccgcggtgctggatagcgatggcagcttttctgtatagc
 aaactgaccgtggataaaagccgctggcagcagggcaacgtgttagctgcagcgtgatg
 catgaagcgcgtgcataaacattatacccaagaaagcctgagcctgagccccgggc **(SEQ ID NO: 6)**

FIG. 34F

M1 = VL -- VH
M2 = VH -- VL
Conectores
Bisagras

IAB2M γ 1 EH3 (M1) (SEQ ID NO: 7)

DIVMTQSPSSLSASVGDRTVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFADYFCQQYNSYPLTFGGGTLKLEIKGSTSGGGSGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTS
GYTFEYTIHWVKQASGKGLEWIGNPNNGGTTYNQKFEDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAAG
WNFDYWGGGTTTVSSSEPKSSDKTHTCPPCPGCGGGSGGGGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG (SEQ ID NO: 7)

IAB2M γ 1 EH5 (M1) (SEQ ID NO: 8)

DIVMTQSPSSLSASVGDRTVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFADYFCQQYNSYPLTFGGGTLKLEIKGSTSGGGSGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTS
GYTFEYTIHWVKQASGKGLEWIGNPNNGGTTYNQKFEDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAAG
WNFDYWGGGTTTVSSSEPKSSDKTHTCPPCPGCGGGSGGGGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO: 8)

FIG. 35A

IAB2M γ 1 EH8 (M1) (SEQ ID NO: 9)

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLT
 SSLQPEDFADYFCQQYNSYPLTFGGGKLEIKGSTSGGGGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTS
 GYTFEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED~~TA~~VYYCAAG
 WNF~~DYWGQGT~~TVTVSS~~ELK~~TP~~LG~~DTHTC~~PP~~CP~~PC~~GG~~SS~~GGSGGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPG (SEQ ID NO: 9)

IAB2M γ 1 EH3 (M2) (SEQ ID NO: 10)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRATLTVDKS
 TSTAYMELSSLRSED~~TA~~VYYCAAGWNFDYWGQGTTVTVSSG~~STSGGGGGGGSS~~DIVMTQSPSSLSASV
 GDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYFCQ
 QYNSYPLTFGGGKLEIK~~EPKSSD~~KTHC~~PP~~CP~~PC~~GG~~SS~~GGSGGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PG (SEQ ID NO: 10)

FIG. 35B

IAB2M γ 1 EH5 (M2) (SEQ ID NO: 11)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRATLTVDKS
TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTIVTVSSGTSGGSGGGSGGGSSDIVMTQSPSSLSASV
GDRVITICKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTITSSLPQEDFADYFCQ
QYNSYPLTFGGGTKLEIKESDKTHTCPCPCPCGGSGGGSGGGGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO: 11)

IAB2M γ 1 EH8 (M2) (SEQ ID NO: 12)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRATLTVDKS
TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTIVTVSSGTSGGSGGGSGGGSSDIVMTQSPSSLSASV
GDRVITICKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTITSSLPQEDFADYFCQ
QYNSYPLTFGGGTKLEIKELKTIPLGDTTHTCPCPCPCGGSGGGSGGGGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
SLSLSPG (SEQ ID NO: 12)

FIG. 35C

Dominios VH y VL

Secuencias variable ligera (VL) y pesada (VH) de IAB2M

VL

DIVMTQSPSSLASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRH
TGVPDRFTGSGSGTDFLTITSSLPEDFADYFCQQYNSTPLTFGGGTKLEIK

(SEQ ID NO: 13)

VH

EVQLVQSGAEVKKPGASVKISKTSQYTFTEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNN
GGTTYNQKFEDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGGQGT

VTVSS (SEQ ID NO: 14)

FIG. 36A

Secuencias variable ligera (VL) y pesada (VH) de IAB22M

VL
 DVQITQSPSSLASVGDRTTITCRTSRISQYLAWYQQKPKLLIYSGSTL
 QSGVPSRFSGSGTDFLTITISLQPEDVATYYCQQHNENPLTFGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 15)

VH
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHFVVRQAPGKLEWIGRIDPA
 NDNTLYASKFQGKATISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGYVYVFDHW
 GQGTLVTVSS **(SEQ ID NO: 16)**

FIG. 36B

Secuencias variable ligera (VL) y pesada (VH) de IAB20M

VL

DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSNDVAWYQQKPGQAPRLLISYTSR
YAGVPDRFSGSGGTDFLTITISLQAEDVAVYCCQDYNPPFTFGQGTKVEIK

(SEQ ID NO: 17)

VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTGYMHWRQAPGQGLEWIGRINPN
NGVTLYNQKFKDRVTMTVDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARSTMITNYVMD
YWGQGTLLVTVSS **(SEQ ID NO: 18)**

FIG. 36C

Secuencias variable ligera (VL) y pesada (VH) anti-CD3

VL
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASSSVSYMNWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLA
 SGVPAHFRGSGGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKVEIK

(SEQ ID NO: 19)

VH
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPS
 RGYTNYNQKFKDRVTMTDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARYYDDHYSLDY
 WGQGTLLVTVSS **(SEQ ID NO: 20)**

FIG. 36D

Secuencias variable ligera (VL) y pesada (VH)
de IAB1M (A11)

VL

DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSSVRFIHWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLA
SGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWGSSTFTFGQGTKVEIK

(SEQ ID NO: 67)

VH

EVQLVEYGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDYIHWVRQAPGKGLEWVAWIDPE
NGDTEFVVPKFQGRATMSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCKTGGFWGGTLLV

TVSS (SEQ ID NO: 68)

FIG. 36E

Secuencias conectoras:

GGGGS	5 aa	(SEQ ID NO: 66)
GGGGSGGGGS	10 aa	(SEQ ID NO: 65)
GGGGSGGGSGGGGS	15 aa	(SEQ ID NO: 64)
GSTSGGGSGGGGS	12 aa	(SEQ ID NO: 63)
GSTSGGGSGGGSGGGGS	18 aa	(SEQ ID NO: 62)

FIG. 37

Bisagra completa:						
Superior		Central	Inferior			
NH1 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 21)	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 45)	CPPCP (SEQ ID NO: 51)	APELLGGP (SEQ ID NO: 58)			
EH1 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 22)	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 45)	CPPC (SEQ ID NO: 50)	GGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)			
NH2 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 23)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCP (SEQ ID NO: 51)	APELLGGP (SEQ ID NO: 58)			
EH2 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 24)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPC (SEQ ID NO: 50)	GGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)			
NH3 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 25)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCP (SEQ ID NO: 52)	APELLGGP (SEQ ID NO: 58)			
EH3 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 26)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCP (SEQ ID NO: 52)	GGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)			
NH4 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 27)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCVCPPC (SEQ ID NO: 53)	APELLGGP (SEQ ID NO: 58)			
EH4 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 28)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCVCPPC (SEQ ID NO: 53)	GGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)			
NH5 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 29)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCPCPPC (SEQ ID NO: 54)	APELLGGP (SEQ ID NO: 58)			
EH5 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 30)	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 46)	CPPCPCPPC (SEQ ID NO: 54)	GGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)			

FIG. 38

Bisagra completa:			
	Superior	Central	Inferior
NH1 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 31)	ERK (SEQ ID NO: 47)	CCVECPPCP (SEQ ID NO: 55)	APPVAGP (SEQ ID NO: 60)
EH1 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 32)	ERK (SEQ ID NO: 47)	CCVECPPCP (SEQ ID NO: 55)	GGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
NH2 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 33)	ERK (SEQ ID NO: 47)	SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)	APPVAGP (SEQ ID NO: 60)
EH2 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 34)	ERK (SEQ ID NO: 47)	SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)	GGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
EH6 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 35)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)	CVECPPC (SEQ ID NO: 57)	GGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
EH7 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 36)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)	CPECPPC (SEQ ID NO: 52)	GGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
EH8 de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 37)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 48)	CPPECPPC (SEQ ID NO: 54)	GGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)
NH de IgG4 (SEQ ID NO: 38)	ESKYGPP (SEQ ID NO: 49)	CPPCP (SEQ ID NO: 51)	APEFLGPP (SEQ ID NO: 61)
EH de IgG4 (SEQ ID NO: 39)	ESKYGPP (SEQ ID NO: 49)	CPPCP (SEQ ID NO: 51)	GGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)

FIG. 38 continuación

Dominios CH3:

CH3 de IgG1 humana (alotipo G1m1)
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

CH3 de IgG1 humana (alotipo nG1m1)
 GQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

CH3 de IgG2 humana
 GQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

CH3 de IgG3 humana
 GQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 43)

CH3 de IgG4 humana
 GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLLTVD
 KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 44)

FIG. 39

Alineamiento comparado IAB22M y1 EH1 (M1) (SEQ ID NO: 105) frente a IAB22M y1 EH3 (M1) (SEQ ID NO: 106), las diferencias se muestran en recuadros.

```

IAB22M y1 EH1 (M1) METDTLLLVLLVLLWVPGSTGCVQITQSPSSLSASVCDRAVTIICRTSRSLISQYLAWYQCKP 60
IAB22M y1 EH3 (M1) METDTLLLVLLVLLWVPGSTGCVQITQSPSSLSASVCDRAVTIICRTSRSLISQYLAWYQCKP 60
IAB22M y1 EH1 (M1) GKVPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLOPEDVATYYCQOHNEPLIFGG 120
IAB22M y1 EH3 (M1) GKVPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLOPEDVATYYCQOHNEPLIFGG 120
IAB22M y1 EH1 (M1) GTKVEIKGSTSGGSGGSGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGCFNIKDTYIH 180
IAB22M y1 EH3 (M1) GTKVEIKGSTSGGSGGSGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGCFNIKDTYIH 180
IAB22M y1 EH1 (M1) FVRQAPGKGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQCKATISADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTAVYY 240
IAB22M y1 EH3 (M1) FVRQAPGKGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQCKATISADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTAVYY 240
IAB22M y1 EH1 (M1) CCRGYGYVFDHWGQCTLVVSSEPKS [C DKTHTCP] [-----] PCGGSSSGGSGGQPREPQVY 297
IAB22M y1 EH3 (M1) CCRGYGYVFDHWGQCTLVVSSEPKS [S DKTHTCP] [FCP] PCGGSSSGGSGGQPREPQVY 300
IAB22M y1 EH1 (M1) LPPSR [DEL] TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFTLYSKL 357
IAB22M y1 EH3 (M1) LPPSR [EEM] TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFTLYSKL 360
IAB22M y1 EH1 (M1) TVDKSRWQCGNVFSCSVMEALHNHYTKSLSPG [K 394] (SEQ ID NO: 105)
IAB22M y1 EH3 (M1) TVDKSRWQCGNVFSCSVMEALHNHYTKSLSPG [ 396] (SEQ ID NO: 106)

```

FIG. 40

IAB22M y1 EH3(M1), las regiones CDR se definen por la definición de Chothia (SEQ ID NO: 106)

```
atggagaccgataaccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtgcccggctccacaggc
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
```

Secuencia de péptido señal

```
gatgtgcagatcacacagagccctagcagcctgagcggccagcgtgggagatagagtcacc
D V Q I T Q S P S S L S A S V G D R V T
```

VL

```
Atcacatgc aggaaccagcagaagcattagccagtagcctggcc cggtagccagcaaaagccc
I T C R T S R S I S Q Y L A W V Q Q K P
```

LCDR1

```
Ggcaagggtgcccgaagctgctgatctac agcgggctccaccctgcagagc ggcgtgcccagc
G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
```

LCDR2

```
agattctccgggtccggaagcggcacagactttaccctgaccatctctccctccagccc
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
```

```
gaggatgtgcgacccactactgc cagcagcacaacgaaaaccccctgaca ttggggggc
E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
```

LCDR3

```
ggcaccgaaggtggagatcaag ggcagcaccagcgggtggaggaagtggaggtggaagtgga
G T K V E I K G S T S G G G S G G G S G
```

Conector

```
Ggaggcgggaagcagc gaggtgcagctggtggagagtggtggaggactggtgcagcccga
G G G S S E V Q L V E S G G G L V Q P G
```

Conector

VH

```
Ggcagcctgcagactgagctgtgtgtgcctcc ggattcaatatcaaggacacc tacatccac
G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H
```

HCDR1

```
ttcgtgagacaggccccggcaagggaactggagtggttgggaaggatc gaccccgccaac
F V R Q A P G K G L E W I G R I D P A N
```

HCDR2

```
gacaac accctgtacgccagcaaatccaggggcaaggccacacatcagcgcgcgacaccagc
D N T L Y A S K F Q G K A T I S A D T S
```

HCDR2

```
aagaacaccgcctatctgcagatgaactccctgagagccgaggacacagccgtgtactac
K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y
```

FIG. 41

tggggcagg gggtacgggtattacgtgttcgaccac tggggccagggcaccctggtgaca
 C G R G Y G Y Y V F D H W G Q G T L V T
 HCDR3
 gtgagcagc gaacccaagagctccgacaagaccacacc tgtcccccttgccctccttgt
 V S S E P K S S D K T A T C P P C P P C
 Bisagra superior Bisagra central
ggcggaggaagctccggaggcgggaagcggag gacagcctagggagccccaggtgtatacc
C G G S S G G G S G G Q P R E P Q V Y T
 Bisagra inferior CH3
 cccccccctccaggggaagagatgaccaagaaccaggtgagcctgacctgcctcgtgaag
 L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K
 ggcttttateccctccgatatacgccgtggagtgggagagcaacggccagcctgagaacaat
 G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N

 tacaagaccacccccctgtgctggactccgatggcagattcttcctgtattccaagctg
 Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L
 accgtcgacaagtcacaggtggcaacagggcaacgtcttcagctgcagcgtgatgcacgag
 T V D K S R W Q Q G N V P S C S V M H E
 gccctgcacaatcactacaccacagaagtcctctcctcgagccccggctga (SEQ ID NO: 140)
 A L H N H Y T Q K S L S L S P G Stop (SEQ ID NO: 106)

FIG. 41
continuación

IAB22M γ1 EH5 (M1) (SEQ ID NO: 107)

atggagacagacacccctcctcctgtgggtgctgctgctgctggtggcgatccacggga
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gacgtgcagatcacacagagccccagctccctgtccgctagcgtggcgacagagtgacc
D V Q I T Q S P S S L S A S V G D R V T
atcacctgcaggaccagcaggagcatctcccagtagctcgttggtaccagcagaagcct
I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
ggcaaggtgcccagctgctgatttacagcggatccaccctgcagagcggcgctgcttagc
G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
aggtttagcggcagcggatccggaacagacttcaccctgacctcagcagcctgcagcct
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
gaagatgtggccacctactactgtcagcagcacaacgaaaacccccctcaccttcggcggc
E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
ggcacaaggtggaaatcaagggcagcacctccggaggaggcagcggcggaggcagcggga
G T K V E I K G S T S G G G S G G G S G
ggcggcggcctccagcgaagtgcagctcgtcgagagcggaggcggactggcgcaacccgga
G G G S S E V Q L V E S G G G L V Q P G
ggaagcctgaggctgagctgtgcggccagcggccttcaacatcaaggacacatacattcac
G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H
tttgtgaggcaggtcctcctggaaagggcctggagtggatcggcagaatcgaccccgtaac
F V R Q A P G K G L E W I G R I D P A N
gacaacaccctgtacgccagcaagttccagggaaggccaccatctccgccgacacaagc
D N T L Y A S K F Q G K A T I S A D T S
aagaataaccgcctacctgcagatgaactccctgagggccgaggataaccgcctgtactac
K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y
tgcggcagggcctatggctactacgtgtttgaccactggggccagggcacactgggtgaca
C G R G Y G Y Y V F D H W G Q G T L V T
gtgagctccgagcccaagagctccgacaagacacacacctgccctccttgcccccttgt
V S S E P K S S D K T H T C P P C P P C
cctccctgtggaggaggaagcagcggaggaggaagcggcgacagcccagagagcctcaa
P P C G G G S S G G G S G G Q P R E P Q
gtgtataccctgccccctccagggaagagatgaccaagaacagggtgagcctgacatgc
V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C
ctgggtcaaagccttctaccccagcgtatattgctgtggagtgggagagcaacggccagccc
L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P
gagaacaactacaagaccacaccccccgctcctggatagcgtatggcagctcctcctgtac

FIG. 42

E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y
agcaagctgacctggacaagtcacaggtggcagcagggcaacgtcttctctctgcagcgtg
S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V
atgcacgaggtctctgcataaccactacacacagaagtcctctcagcctgagccttgatga (SEQ ID NO: 141)
M H E A L E N H Y T Q K S L S L S P C Parada (SEQ ID NO: 107)

FIG. 42
continuación

IAB22M γ1 EH7(M1) (SEQ ID NO: 108)

atggagacagacacccctcctcctgtgggtgctgctgctgctggtggcccgatccaccgga
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gacgtgcagatcacacagagccccagctccctgtccgctagcgtggggacagagtgacc
D V Q I T Q S P S S L S A S V G D R V T
atcacctgcaggaccagcaggagcatctcccagtagcctcgttggaccagcagaagcct
I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
ggcaaggcgcccaagctgctgatttacagcggatccaccctgcagagcggcgtgcctagc
G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
aggtttagcggcagcggatccggaacagacttcacccctgaccatcagcagcctgcagcct
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
gaagatgtggccacctaactactgtcagcagcacacgaaaacccctcaccttcggcggc
E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
ggcacaaagggtggaatcaagggcagcacctccggaggaggcagcggcggaggcagcggga
G T K V E I K G S T S G G G S G G G S G
ggcggcggctccagcgaagtgcagctggtcgagagcggaggcggactggtgcaaccggga
G G G S S E V Q L V E S G G G L V Q P G
ggaagcctgaggctgagctgtgccgccagcggcttcaacatcaaggacacatacattcac
G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H
ttcgtgaggcaggctcctggaaaggcctggagtggatcggcagaatcgaccccgctaac
F V R Q A P G K G L E W I G R I D P A N
gacaacacccctgtacgccagcaagttccaggggcaaggccaccatcctccgccgacadaagc
D N T L Y A S K F Q C K A T I S A D T S
aagaataccgccctacctgcagatgaactccctgaggggcggaggataccgccgtgtactac
K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y
tgccgcaggggcctatggctactacgtgtttgaccactggggccagggcacaactggtgaca
C G R G Y G Y Y V F D H W G Q G T L V T
gtgagctccgagctgaagacacctctggcgacacacacacaccccgcccccttgcct
V S S E L K T P L G D T T H T C P P C P
ccctgtggaggaggcagcagcggaggagggaagcggcggacagcccagagagcctcaagtg
P C G G G S S G G G S G G Q P R E P Q V
tataccctgccccctccagggaagagatgaccaagaaccagggtgagcctgacatgcctg
Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L
gtcaaaggcttctaccccagcgatattcgtgtggagtgggagagcaacggccagcccag
V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E
aacaactacaagaccacacccccctcctggatagcgatggcagccttctcctgtacagc
N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S

FIG. 43

asgctgaccgtggacaagtcaggtggcagcagggcacgctcttctcctgcagcgtgatg
K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M
cacgagggtctgcataaaccactacacacagaagtcctcctcagcctgagcctggatga (SEQ ID NO: 142)
H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G Parada (SEQ ID NO: 108)

FIG. 43
continuación

IAB22M γ1 EH8 (M1) (SEQ ID NO: 109)

atggagacagacaccctcctcctgtgggtgctgctgctgtgggtgcccggatccaccgga
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gacgtgcagatcacacagagccccagctccctgtccgctagcgtgggcgacagagtgacc
D V Q I T Q S P S S L S A S V G D R V T
atcacctgcaggaccagcaggagcatcctccagctacctcgttggaccagcagaagcct
I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
ggcaaggtgcccagctgctgatttacagcggatccaccctgcagagcggcgtgcctagc
G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
aggtttagcggcagcggatccggaaacagacttcaccctgaccatcagcagcctgcagcct
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
gaagatgtggccacctactactgtcagcagcacaacgaaaaacccctcaccttcggcggc
E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F C G
ggcacaaggtggaaatcaaggcagcacctccggaggaggcagcggcggaggcagcggga
G T K V E I K G S T S G G G S G G G S G
ggcggcggctccagcgaagtgcagctggtcgagagcggagcggactggtgcaacccgga
G G G S S E V Q L V E S G G G L V Q P G
ggaagcctgaggetgagctgtgccgccagcggctccaacatcaaggacacatacatcac
G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H
tttgtgaggcaggtcctcggaaaggcctggagtggatcggcagaatcgaccccgctaac
F V R Q A P G K G L E W I G R I D P A N
gacaacaccctgtacgccagcaagttccaggggcaaggccaccatctccgcgcacacaagc
D N T L Y A S K F Q G K A T I S A D T S
aagaataccgcctacctgcagatgaactccctgagggccgaggataccgcctgtactac
K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y
tgccgcagggctatggctactacgtgtttgaccactggggccagggcacactggtgaca
C G R G Y G Y Y V F D H W G Q G T L V T
gtgagctccgagctgaagacacctctgggcgacacaacacacacctgccctccttgcccc
V S S E L K T P L G D T T H T C P P C P
ccttgccctcctgtggaggaggaagcagcggaggaggaagcggcggacagcccagagag
P C P P C G G G S S G G G S G G Q P R E
cctcaagtgtataccctgccccctccagggaagagatgaccaagaaccaggtgagcctg
P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L
acatgcctgggtcaaaggcttctaccccagcgataattgctgtggagtgggagagcaacggc
T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G
cagcccgagaacaactacaagaccacaccccccgccctggatagcgatggcagcttcttc
Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F

FIG. 44

ctgtacagcaagctgacccgtggacaagtcaggtggcagcagggcaacgtttctcctgc
L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C
agcgtgatgcacgaggctctgcataaccactacacacagaagtccttcagcctgagcct
S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
ggatga (SEQ ID NO: 143)
GParada (SEQ ID NO: 109)

FIG. 44
continuación

IAB22M γ 2 EH2 (M1) (SEQ ID NO: 110)

atggaaaccgacacactgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtccctgggtccaccgga
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gacgtccagatcacacagagccccagcagcctgtccgcccagcgtgggagacagggtagc
D V Q I T Q S P S S L S A S V G D R V T
atcacctgcaggaccagcagatccatcctccagtatctggcctggtagccaacagaagccc
I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
ggcaagggtcccccactgctgatctacagcgggtccaccctgcagtcggcgtgcctagc
G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
agggttctccggcagcggatccggcaccgacttcaccctgaccatcagctccctgcagcct
R F S C S C S C T D F T L T I S S L Q P
gaggacgtggctacctactactgccaaacagcacaaacgagaacccccctgacctttggaggc
E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
ggcaccgaagggtggaatcaagggcagcaccagcggcggaggaagcggaggaggatccgga
G T K V E I K G S T S G G G S G G G S G
ggaggcgggaagctccgaggtgcagctggtggaaagcggcggcggactggtgcagcctgga
G G G S S E V Q L V E S G G G L V Q P G
ggaagcctcagactgagctgtgcgccagcggatccaacatcaaagacacctacatccat
G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H
ttcgtgagacagggcccccggaagggcctogaatggatcggaaggatcgacccccgctaac
F V R Q A P G K G L E W I G R I D P A N
gacaataacctgtacgcctccaagttccagggaaggccaccatcctccgcccagataacctcc
D N T L Y A S K F Q G K A T I S A D T S
aagaacaccgcctacctccagatgaactccctgagggcogaagataccgcctctactac
K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y
tgtggcaggggtacggctactatgtgtcgatcactggggccaaggaacctgtgtagcc
C G R G Y G Y Y V F D H W G Q G T L V T
gtgagcagcgaaaggaagagctgcgtggagtgtcctccttgtcccggcggcgggtccagc
V S S E R K S C V E C P P C P G G G S S
ggcggagggtccggcggccagcctagagaacctcaggtgtacacctccccccctccaga
G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P S R
gaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtgaaaggcttctatccagc
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S
gacatcgccgtggaatgggagtcacaacggccagcccagagaacaactacaagaccacctcc
D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
cccattgctggattccgacggcagctttttctctgtagcagaagctcacctggacaaagagc
P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S

FIG. 45

agatggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggtctctgataaccac
R W Q Q G N V F S C S V M R E A L H N H
tacacccagaagagcctgtccotgtcccccggatga (SEQ ID NO: 144)
Y T Q K S L S L S P G Parada (SEQ ID NO: 110)

FIG. 45
continuación

ES 3 020 458 T3

IAB22M γ2 EH2 (M1) (VH-K67R) (SEQ ID NO: 111)

atggagaccgacacccctcctcctgtgggtgctgctgtgctgggtgacctggaagcaccggc
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gatgtgcagatcacccagagccctagcagcctgtccgcctccgtggggcgacagggtgacc
D V Q I T Q S P S S L S A S V G D R V T
atcacctgtaggacctccaggagcatcctccagtagacctggcctgggtaccagcagaagccc
I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
ggcaaggtgcccaaacctgctcatctactccggcgagcacactccagagcggcgctccctagc
G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
agattcagcgggaagcggcagcggcaccgacttcacctgaccatcagctccctgcagccc
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
gaggacgtggccacctattactgtcagcagcacaaacgaaaacccccctgaccttcggcgggc
E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
ggcacaaaagtggagatcaagggcagcaccagcggaggcgggatccggcgggcggcagcggc
G T K V E I K G S T S G G S G G S G
ggcggaggatccagcgaagtgcagctggtcgaaaagcggaggcggactggtgcagcctgga
G G G S S E V Q L V E S G G G L V Q P G
ggaagcctgagactcagctgcgcgcgccctccggattcaacatcaaggacacctacatccac
G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H
ttcgtgaggcaggctcccggaaggcctcgagtggattggaaggattgaccccgccaac
F V R Q A P G K G L E W I G R I D P A N
gacaacaccctgtacgcagcaggttccaaggaagggccaccatctccgcgacaccagc
D N T L Y A S K F Q G R A T I S A D T S
aagaataccgcctacctgcagatgaactccctgagggctgaggacaccgcctgtactac
K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y
tgcggcagaggctacggctactacgtgtcgaccactggggacagggcacactggtgaca
C G R G Y G Y Y V F D H W G Q G T L V T
gtgagcagcagagaggaaaagctgcgtggagtgcctccctgcctggcgggcgagctcc
V S S E R K S C V E C P P C P G G G S S
ggcggaggaagcggaggacaaccaggaggcccggtgtacacactccccctagcagg
G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P S R
gaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctcgtgaagggattctaccccagc
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S
gacattgccgtcgagtgaggagagcaacggccagcctgagaacaactacaagacaaccccc
D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
cctatgctcgatagcgatggctccttcctcctgtactccaagctcacogtcgacaagagc
P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S

FIG. 46

aggtyggcagcagggcgaacgtctttctctgtagcgtgatgcacgaggtcttgcaacaaccac
R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H
tacacccagaagagcctgagcctgagcccggtga (SEQ ID NO: 145)
Y T Q K S L S L S P G Parada (SEQ ID NO: 111)

FIG. 46
continuación

Alineamiento comparado IAB2M y1 EH1 (M2) (SEQ ID NO: 112) frente a IAB2M y1 EH3 (M2) (SEQ ID NO: 113), las diferencias se muestran en recuadros.

IAB2M y1 EH1 (M2)	METDTLLLVLLLVLPSTGCEVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTHHWKQA	60
IAB2M y1 EH3 (M2)	METDTLLLVLLLVLPSTGCEVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTHHWKQA	60
IAB2M y1 EH1 (M2)	SKGGLWIGININPNNGCTTNNQKFDRAFLTVDKSTSTAYMELSSLSSESDIAYVYCAAGW	120
IAB2M y1 EH3 (M2)	SKGGLWIGININPNNGCTTNNQKFDRAFLTVDKSTSTAYMELSSLSSESDIAYVYCAAGW	120
IAB2M y1 EH1 (M2)	NEDYWGQCTTVTVSSGCTSGCGSCGCGGSSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQ	180
IAB2M y1 EH3 (M2)	NEDYWGQCTTVTVSSGCTSGCGSCGCGGSSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQ	180
IAB2M y1 EH1 (M2)	DVGTAVDWYQQKSPGKAPKLLIYNASTRHGVDPDFTCSGSGTDFLTITSSLOPEPADIYF	240
IAB2M y1 EH3 (M2)	DVGTAVDWYQQKSPGKAPKLLIYNASTRHGVDPDFTCSGSGTDFLTITSSLOPEPADIYF	240
IAB2M y1 EH1 (M2)	CQQYNSYPLTFGGGCKLEIKEPKS	297
IAB2M y1 EH3 (M2)	CQQYNSYPLTFGGGCKLEIKEPKS	297
IAB2M y1 EH1 (M2)	CQQYNSYPLTFGGGCKLEIKEPKS	300
IAB2M y1 EH3 (M2)	CQQYNSYPLTFGGGCKLEIKEPKS	300
IAB2M y1 EH1 (M2)	SRDELTKNQVSLTCLVKCFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSKLTVD	357
IAB2M y1 EH3 (M2)	SRDELTKNQVSLTCLVKCFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSKLTVD	357
IAB2M y1 EH1 (M2)	KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	391
IAB2M y1 EH3 (M2)	KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	391
IAB2M y1 EH1 (M2)	KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	393
IAB2M y1 EH3 (M2)	KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	393

FIG. 47

IAB2M γ 1 EH3 (M2), las regiones CDR se definen por la definición de Chothia (SEQ ID NO: 113)

```
atggaaacccgacaccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtgcccaggatctacaggc
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
```

Secuencia de péptido señal

```
gagggtgcagctgggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggcgccctccgtgaagatc
E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K I
```

VH

```
tectgcaagacctccggctacaccttcacccgagtagccatccactgggtcaagcaggcc
S C K T S G Y T F T E Y T I H W V K Q A
```

HCDR1

```
tcggcaagggtcctggaatggatcgccacatcaacccccacacggcgccaccacotac
S G K G L E W I G N I N P N N G G T T Y
```

HCDR2

```
aacccagaagtccgaggaccggccaccctgaccgtggacaagtctacntccaccgcctac
N Q K F E D R A T L T V D K S T S T A Y
atggaaactgtctccctcgaggagcgaggacacccgcgtgtactattgtgcctgtggctgg
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A A G W
```

HCDR3

```
aacttcgactacggggccagggccaccacccgtgacagtgctcctctggctctacctccggc
N F D Y W G Q G T T V T V S S G S T S G
```

HCDR3

Conector

```
ggagggaagtggcgaggatcaggcgaggcggtcctctgatatcgatgacccagtc
G G S G G G S G G G S S D I V M T Q S
```

Conector

VL

```
ccctccagcctgtctgtctccgtggcgacagagtgaccatcacatgcaggcctccag
P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q
```

LCDR1

```
gacgtgggcaccgctgtggatgggtatcagcagaagcctggcaaggcccccaagctgctg
D V G T A V D W Y Q Q K P G K A P R L L
```

LCDR1

```
atctacggggcctctaccagacacaccggcggtgcctgatagattcacccgctctggatcc
I Y W A S T R H T G V P D R F T G S G S
```

LCDR2

```
ggcaccgaccttacctgaccateagctccctgcagcccgaggacttcggcgaactacttc
G T D F T L T I S S L Q P E D F A D Y F
tgcagcaggtacaactcctacccccgaccttgggggagggcaaccaagctgggaattcaaa
C Q Q Y N S Y P L T F G G G T K L E I R
```

FIG. 48

LCDR3		
gagcccaagtcctccgacaagaaccacacc	tgtccccccttgccctccatgt	ggtggggga
E P K S S D K T H T	C P P C P P C	G G G
Bisagra superior	Bisagra central	Bisagra inferior
agttctgggggaggttctgt	ggccagcctcggggaacctcaggtgtacacactgccccct	
S S G G G S G	G Q P R E P Q V Y T L P P	
Bisagra inferior	CH3	
agccgggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctcgtgaagggcttctac		
S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y		
ccctccgatatacgccgtggaatgggagtcacaacggccagcccgagaaacaactacaagacc		
P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T		
acccccctgtgtgtggactccgaacgggtcattcttccctgtactccaagctgacagtggtat		
T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D		
aagtcocgggtggcagcagggcaacgtgttctcctgtcccgatgcacgaggccctgcac		
K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H		
aaccactatacccagaagtcctctgtccctgagcccccggctga	(SEQ ID NO: 146)	
N H Y T Q K S L S L S P G	Stop (SEQ ID NO: 113)	

FIG. 48
continuación

IAB2M γ1 EH3 (M2) (alotipo G1m1) (SEQ ID NO: 114)

atggaaacccgataccctgctgctgtggtgctgctgctgctggtgcccggcagccacccggc
M E T D T L L L W V L L L W V P C S T G
gaagtgcagctggtgcagagcggcggcgaagtgaaaaaaacggcgagcgtgaaaatt
E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K I
agctgcataaacccagcggctataccctttaccgaatataccattcatttgggtgaaacaggcg
S C K T S G Y T F T E Y T I H W V K Q A
agcggcgaaggcctgggaatggattggcaccattaccgaacaaacggcgccaccacctat
S G K G L E W I G N I N P N N G G T T Y
aacccagaattttgaagatcgccgacccctgacccgtggataaaaagcaccagccacccggtat
N Q K F E D R A T L T V D K S T S T A Y
atggaaactgagcagcctggcggcagcgaagataccggcgggtgtattatttgcgcggcgggtgg
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A A G W
aactttgattatttggggccaggccaccacccgtgacccgtgagcagcggcagcaccagcggc
N F D Y W G Q G T T V T V S S G S T S G
ggcggcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
G G S G G G S G G G G S S D I V M T Q S
ccgagcagcctgagcggcagcgtggcgatcgccgtgacccattacccgcaaaagcagcgcag
P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q
gatgtggcaccgcgggtggatttggatcagcagaacccggcgaaggcgcgaacactgctg
D V G T A V D W Y Q Q K P G K A P K L L
atttattggggcagcaccggccataccggcgtgcgggatcgctttaccggcagcggcagc
I Y W A S T R H T G V P D R F T G S G S
ggcaccgattttaccctgacccattagcagcctgcagccgggaagattttgaggatttttt
G T D F T L T I S S L Q P E D F A D Y F
tgccagcagttataacagctatccgctgacottttggcggcggcaccacaaactggaaattaaa
C Q Q Y N S Y P L T F G G G T K L E I K
gaaccgaaaagcagcgataaaacccataccctgcccgccgtgcccgccgtgcggcggcggc
E P K S S D K T H T C P P C P P C G G G
agcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
S S G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P
agcccgcatgaactgacaaaaaacagggtgagcctgacccgtgctggaaggccttttat
S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y
ccgagcgatatttgcgggtggaatggaagcaacggccagccggaaaacaactataaaacc
P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T
accccgccggctgctggcagcgatggcggctttttctgtatagcgaactgacccgtggat
T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D

FIG. 49

aaaagccgctggcagcaggggcaacgtgcttagctgcagcgtgatgcatgaagcgtgcat
K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L R
aacattatascddagaaaagcctgagcctgagcccggtga (SEQ ID NO: 147)
N H Y T Q K S L S L S P G Parada(SEQ ID NO: 114)

FIG. 49
continuación

IAB2M γ 1 EH5 (M2) (SEQ ID NO: 115)

atggaaaacgataaccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtgccgggcagcacccggc
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gaagtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaaccgggcgcgagcgtgaaaatt
E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K I
agctgcaaaaccagcggcctataccctttaccgaatataaccattcattgggtgaaacaggcg
S C K T S G Y T F T E Y T I H W V K Q A
agcggcgaaggcctggaatggattggcaacattaaccgaacaacggcgccaccacctat
S G K G L E W I G N I N P N N G G T T Y
aaccagaaatttgaagatcgcgcgaccctgacccgtggataaaaagcaccagcaccgcgtat
N Q K F E E D R A T L T V J K S T S T A Y
atggaaactgagcagcctgcgcgagcgaagataaccgcggtgtattattgcgcgggcggtgg
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A A G W
aactttgattatttggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagcggcagcaccagcggc
N F D Y W G Q G T T V T V S S G S T S G
cggcggcagcggcgcgcgagcggcgggcgcggcagcagcgatattgtgatgaccagagc
G G S G G G S G G G G S S D I V M T Q S
ccgagcagcctgagcgcgagcgtggcgatcgcgtgaccattacctgcaaagcgagccag
P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q
gatgtgggcaccgcggtggatttggtatcagcagaaaaccgggcgaagcgcgaaactgctg
D V G T A V D W Y Q Q K P G K A P K L L
atatttggggcagcaccgcgcataaccggcgtgcggatcgcctttaccggcagcggcagc
I Y W A S T R H T G V P J R F T G S G S
cgcaccgattttaccctgaccattagcagcctgcagccggaagattttgcggattatttt
G T D F T L T I S S L Q P E D F A D Y F
tgccagcagttataacagctatccgctgacctttggcggcgggcaccaaaactggaaattaaa
C Q Q Y N S Y P L T F G G G T K L E I K
gaaccgaaaagcagcgataaaaccatacctgcccgcggtgccgcggtgccgcgctgc
E P K S S D K T H T C P P C P P C P P C
cggcgccgcgagcagcggcgggcggcagcggcgccagccgcgcgaaccgcaggtgtatacc
G G G S S G G G S G G Q P R E P Q V Y T
ctgccgcgagccgcgaagaaatgacaaaaaccaggtgagcctgacctgcttggtgaaa
L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K
cgcttttatccgagcgatattgcggtggaatgggaaagcaacggccagccgggaaacaac
G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N
tataaaaccacccgcggtgctggatagcgatggcagctttttctgtatagcaaaactg
Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L

FIG. 50

```
accgtggataaaaagccgctggcagcagggcaacggtgtagctgcagcgtgatgcatgaa
T V D K S R W Q Q G M V F S C S V M H E
ggcgtgcataaacattatacccagaaaaagcctgagcctgagcccggtga (SEQ ID NO: 148)
A L H N H Y T Q K S L S L S P G Parada(SEQ ID NO: 115)
```

FIG. 50
continuación

IAB2M γ 1 EH7 (M2) (SEQ ID NO: 116)

atggagacagacacccctcctcctgtgggtgctgctgctgctgctgggtccccggaagcaccgga
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gaagtgcagctggtgcaatccggagccgaggtgaagaaacccggcgccagcgtgaagatt
E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K I
agctgcaaaaccagcggctacaccttcacccgagtagacacccatccactgggtcaagcaggcc
S C K T S G Y T F T E Y T I H W V K Q A
agcggcaaggccctggagtggtacggcaacattaacccccataacggcgccaccacctac
S G K G L E W I G N I N P N N G G T T Y
aatcagaaattcaggacagggccaccctgaccgtggataagtcacacccaccgcctac
N Q K F E D R A T L T V D K S T S T A Y
atggagctgtcccccctgagaagcggagtagacagccgtctactactgcgctgccggatgg
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A A G W
aatttcgaactactggggccagggcacaaacgtgaccgtgagcagcggatccacctccggc
N F D Y W G Q G T T V T V S S G S T S G
ggcgccagcggagggcgccagcggcgaggaggcagcagcgcacatcgtgatgacacagtc
G G S G G G S G G G G S S D I V M T Q S
cccagcagcctgtccgctagcgtggggcgacagagtgaccatcacctgcaaggccctccag
P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q
gacgtgggaaccgctgtggactggtaccagcagaagcccggaaggcccccaagctgctg
D V G T A V D W Y Q Q K P G K A P K L L
atctactggggccagcaccagacacacccggcgtgcctgacagatccaccggcctccggaagc
I Y W A S T R H T G V P D R F T G S G S
ggcaccgaacttcacccctgaccatcagctccctccagcccgaggacttcgcgcgactacttc
G T D F T L T I S S L Q P E D F A D Y F
tgccagcagtataatagctacccccctgaccttcggcgggcgccacaaagctcgaaatcaag
C Q Q Y N S Y P L T F G G G T K L E I K
gagctgaagacccctctcgggagacaccacccacacctgcccccttgccctcctcgtgga
E L K T P L G D T T H T C P P C P P C G
ggcggaagcagcggaggagggaagcggaggacagccagggaaccccgaggtgtacacactg
G G S S G G G S G G Q P R E P Q V Y T L
ccccctccagagaggagatgacaaagaaccaggtgtccctcacctgcctgggtgaaggc
P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G
ttctatccagcgcacatcgccgtggagtgaggagtcacaaggccaaccggaaaacaactac
F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y
aagaccacccctcccgctgctggattccgacggctcctttttccgtacagcaagctgacc
K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T

FIG. 51

gtggacaagtcaggtggcagcagggcaatgtcttagctgcagcgtcatgcaagaggcc
V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A
ctgcataaaccactataaccagaagtcctgtccctcagccctggatga (SEQ ID NO: 149)
L H N H Y T Q K S L S L S P GParada(SEQ ID NO: 116)

FIG. 51
continuación

IAB2M γ 1 EH8 (M2) (SEQ ID NO: 117)

atggaaaccgataaccctgctgctgtggtgctgctgctgtggtggccgggcagcaccggc
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gaagtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaaccgggcgagcgtgaaaatt
E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K I
agctgcaaaaccagcggctatacctttaccgaataaccattcattgggtgaaacaggcg
S C K T S G Y T F T E Y T I H W V K Q A
agcggc aaaggcctggaatggattggcaacattaaccgcgaacaacggcgccaccctat
S G K G L E W I G N I N P N N G G T T Y
aaccagaaatttgaagatcgcgcgaccctgaccgtggataaaagcaccagcaccgcgtat
N Q K F E D R A T L T V D K S T S T A Y
atggaactgagcagcctgcgcagcgaagataaccgcggtgtattattgcgcggcgggctgg
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A A G W
aactttgattattggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagcggcagcaccagcggc
N F D Y W G Q G T T V T V S S G S T S G
ggcggcagcggcggcggcagcggcggcggcggcagcagcgataattgtgatgaccagagc
G G S G G G S G G G G S S D I V M T Q S
ccgagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgaccattacctgcaaagcgagccag
P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q
gatgtgggcaccgcggtggattgggtatcagcagaaaaaccgggcaaagcgcgaaactgctg
D V G T A V D W Y Q Q K P G K A P K L L
atttattgggcgagcaccgcgcataaccggcgtgcccggatcgtttaccggcagcggcagc
I Y W A S T R H T G V P D R F T G S G S
ggcaccgatttttaccctgaccattagcagcctgcagccggaagattttgoggattatttt
G T D F T L T I S S L Q P E D F A D Y F
tgccagcagtataacagctatccgctgacctttggcggcggcacccaaactggaaattaaa
C Q Q Y N S Y P L T F C G G T K L E I K
gaactgaaaaccgcgctgggcgataaccaccatacctgcccgcgctgcccgcgctgcccg
E L K T P L G D T T H T C P P C P P C P
ccgtgcggcggcggcagcagcggcggcggcagcggcggcagcggcggcgaaccgcaggtg
P C G G G S S G G G S G G Q P R E P Q V
tataacctgcccgcgagcgcggaagaaatgacccaaaaccaggtgagcctgacctgacctg
Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L
gtgaaaggcttttatccgagcgatattgcggtggaatgggaaagcaacggccagccggaa
V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E
aacaactataaaaccaccccgccggtgctggatagcgatggcagcttttttctgtatagc
N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S

FIG. 52

aaactgaccgtggataaaaagccgctggcagcagggcaacgtgttttagctgcagcgtgatg
K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M
catgaagcgtgcataaaccattataccacagaaaagcctgagcctgagcccggtga (SEQ ID NO: 150)
H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G Parada (SEQ ID NO: 117)

FIG. 52
continuación

ES 3 020 458 T3

IAB2M γ 1 EH3 (M1) (SEQ ID NO: 118)

atggaaacgataacccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtgccgggagcaccggc
 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
 gatattgtgatgaccagagcccgagcagcctgagcgcgagcgtgggagatcgctgacc
 D I V M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 attacctgcaaagcgagccaggatgtgggcaccgcggtggattgggtatcagcagaaaccg
 I T C K A S Q D V G T A V D W Y Q Q K P
 ggcaaaagcgccgaaactgctgatttattgggagagcaccggccataaccggcgtgcggat
 G K A P K L L I Y W A S T R H T G V P D
 cgetttaccggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccaattagcagcctgcagccg
 R F T G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 gaagattttgcggattatttttgccagcagtataacagctatccgctgaccttggcggc
 E D F A D Y F C Q Q Y N S Y P L T F G G
 ggcaccaaactggaaattaaaggcagcaccagcggcggcggcagcggcggcggcagcggc
 G T K L E I K G S T S G G G S G G G S G
 ggcggcggcagcagcgaagtgcagctggtgcagagcggcggcgaagtgaaaaacgggc
 G G G S S E V Q L V Q S G A E V K K P G
 gcgagcgtgaaaattagctgcaaaaccagcggctatacctttaaccgaatataccattcat
 A S V K I S C K T S G Y T F T E Y T I H
 tgggtgaaacagcggcagcggcgaaggcctggaatggattggcaacattaaaccgaacaac
 W V K Q A S G K G L E W I G N I N P N N
 ggcggcaccacctataaccagaaatttgaagatcgcgcgaccccgaccgtggataaagc
 G G T T Y N Q K F E D R A T L T V D K S
 accagcaccgcgtatattggaactgagcagcctgcgcagcgaagataccgcggtgtattat
 T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y
 tgcgcgcgcggtggaaactttgattattggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagc
 C A A G W N F D Y W G Q G T T V T V S S
 gaaccgaaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 E P K S S D K T H T C P P C P P C G G G
 agcagcggcggcggcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 S S G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P
 agccgcgaagaaatgacaaaaaccaggtgagcctgacctgcccgggtgaaaggcttttat
 S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y
 ccgagcagatattgcgggtggaatgggaaagcaacggccagccggaaaacaacataaaacc
 P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T
 accccgcgggtgctggatagcgatggcagctttttctgtatagcaaaactgaccgtggat
 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D

FIG. 53

aaaagccgctggcagcagggcaacgtgttagctgcagcgtgatgcatgaagcgcctgcac
K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H
aacccattataccagaaaaagcctgagcctgagcccggtga (SEQ ID NO: 151)
N H Y T Q K S L S L S P G Parada (SEQ ID NO: 118)

FIG. 53
continuación

Alineamiento comparado IAB20M Y1 EH1 (M2) (SEQ ID NO: 119) frente a IABM20M Y1 EH3 (M2) (VL-Q79E, V83E; VH-Q1E, Q6E) (SEQ ID NO: 120), las diferencias se muestran en recuadros.

```

IAB20M Y1 EH1 (M2) METDTLLLVLLVLLVPGSTG Q VQLV Q SGAEVKKPGASVAVSCKASGYSETTCYIMHWVRQA 60
IAB20M Y1 EH3 (M2) METDTLLLVLLVLLNVGSGTG E VQLV E SGAEVKKPGASVAVSCKASGYSETTCYIMHWVRQA 60

IAB20M Y1 EH1 (M2) PQQHEWIGRINPNNGVTLVYNQKFKDRVTMTVDSISAYMELSLRLSDDTAVYYCARST 120
IAB20M Y1 EH3 (M2) PQQHEWIGRINPNNGVTLVYNQKFKDRVTMTVDSISAYMELSLRLSDDTAVYYCARST 120

IAB20M Y1 EH1 (M2) MIINYYNDYWGQGLVTVSSGSISSGSGSGSGSGSDIVMTQSPATLSVSPGERATLS 180
IAB20M Y1 EH3 (M2) MIINYYNDYWGQGLVTVSSGSISSGSGSGSGSGSDIVMTQSPATLSVSPGERATLS 180

IAB20M Y1 EH1 (M2) CKASQSVSNDVAVYQKQEGQAPRLLISYTSRYAGVDFRSGSGSGDTFLTISSL Q AED 240
IAB20M Y1 EH3 (M2) CKASQSVSNDVAVYQKQEGQAPRLLISYTSRYAGVDFRSGSGSGDTFLTISSL E AED 240

IAB20M Y1 EH1 (M2) V AVYTCQQDYNGSEFTTGGQGTKEVLEKPKS C DKTHTCP ---- PCGGGSSGGSGGQPREPQV 297
IAB20M Y1 EH3 (M2) E AVYTCQQDYNGSEFTTGGQGTKEVLEKPKS S DKTHTCP PCP PCGGGSSGGSGGQPREPQV 300

IAB20M Y1 EH1 (M2) YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKCFYPSDIAVEMESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS 357
IAB20M Y1 EH3 (M2) YTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS 360

IAB20M Y1 EH1 (M2) KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K 396 (SEQ ID NO: 119)
IAB20M Y1 EH3 (M2) KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG -- 398 (SEQ ID NO: 120)

```

FIG. 54

IAB20M yI EH3(M2) (VL-Q79E, V83E; VH-Q1E, Q6E), las regiones CDR se definen por la definición de Chothia (SEQ ID NO: 120)

atggaaaccgataaccctgctgctgtgggtgctgctgctgctgggtgctgctggcagcacagga.
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G

Secuencia de péptido señal

gaggtgcagctgggtggagagcggcgctgaagtgaagaagcccgcgccagcgtgaaggtg
E V Q L V E S G A E V K K P G A S V K V

VH

agctgcaaggccagc ggtacagcttcacaggctac tacatgcactgggtgagacaagcc
S C K A S G Y S F T G Y Y M H W V R Q A

HCDR1

cctggccagggcctcgagtggttgattggaaggatc aaccccaacaacggagtg acactgtac
P G Q G L E W I G R I N P N N G V T L Y

HCDR2

aactagaattcaaggacaggggcacccatgacccgtggacacccagcatcagcaccgectat
N Q K F K D R V T M T V D T S I S T A Y
atggagctgtccaggcagaggagcagacacccgctgtgtactactgcgcagg agcacc
M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R S T

HCDR3

atgatacccaactacgtgatggattat tggggccagggcacactgggtgacagtgagcagc
M I T N Y V M D Y W G Q G T L V T V S S

HCDR3

ggcagcaccagcggaggaggcagcggaggagggaagcggcggaggcggctcctcc gatato
G S T S G G G S G G G S G G G S S D I

Conector

VL

gtcatgacccagagcccccgtacccctcagcgtgtccctcggcgagagagccaccctgagc
V M T Q S P A T L S V S P G E R A T L S
tgc aaggccagccagtcctgtgtccacgacgtggcc tggatcaccagaagcccgccag
C K A S Q S V S N D V A W Y Q Q K P G Q

LCDR1

gctcctaggctgctgatctcc tacaccagcagcaggtacgcc gggtgctgatagggtc
A P R L L I S Y T S S R Y A G V P D R F

LCDR2

agcggctccggcagcggcacagacttcacccctgacaatcagcagcctggaggccgaggat
S G S G S G T D F T L T I S S L E A E D

FIG. 55

gagggcgtgtactactgt	bagcaggactacaactcccccccaac	ttgggccaggggcaca
E A V Y Y C	Q Q D Y N S P P T	F G Q G T
LCDR3		
aaggtd	gagatcaaggagccataagtcctccgacaagaccacac	tgtccccctgcct
K V	E I K E P K S S D K T H T	C P P C P
Bisagra superior		Bisagra central
cottgt	ggaggcggaagcagcggaggcgggagcgga	ggacagcccagagaaccccagggtg
P C	G G G S S G G G S G	G Q P R E P Q V
Central	Bisagra inferior	CH3
tataacctgccccccctccaggggaggagatgacacaaaaaccagggtgagcctgacatgocctg		
Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L		
gtgaagggctttctacccctccgacatcgccgtggagtgggaaagcaacggccagcccag		
V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E		
aacaactacaagacacacccccctgctggatagcgacggctccttctttctgtacagc		
N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S		
aagctgacccgtggataaaaagcagggtggcagcaaggcaacgtgtctctcctgctccgtcatg		
K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M		
cacgaggctctgcataaccactacaaccaaaaaatccctgagcctgagcccccggctga (SEQ ID NO: 152)		
H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G Stop (SEQ ID NO: 120)		

FIG. 55
continuación

IAB20M γ1 EH3 (M2) (SEQ ID NO: 121)

atggaaaccgataaccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtgccgggcagcaccggc
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaacaaaccggcgcgagcgtgaaagtg
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
agctgcaaagcagcggcctatagctttaccggctattatgcatgtgggtgcccaggcg
S C K A S G Y S F T G Y Y M H W V R Q A
ccgggccaggcctggaatggattggccgcattaaccggaacaacggcgtgaccctgtat
P G Q G L E W I G R I N P N N G V T L Y
aaccagaaatttaagatcgcgtgaccatgaccgtggataaccagcattagcaccgcgtat
N Q K F K D R V T M T V D T S I S T A Y
atggaaactgagccgcctgcccagcgcgatgataccgcgggtgtattattgcccgcgcagcacc
M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R S T
atgattaccaactatgtgatggattatggggccaggcgaccctgggtgaccgtgagcagc
M I T N Y V M D Y W G Q G T L V T V S S
ggcagcaccagcggcgggcggcagcggcgggcggcagcggcgggcgggcggcagcagcgcataat
G S T S G G G S G G G S G G G G S S D I
gtgatgaccagagcccgccgaccctgagcgtgagcccgccgaacgcgcgaccctgagc
V M T Q S P A T L S V S P G E R A T L S
tgcaaagcgcagccagagcgtgagcaacgatgtggcgtggtatcagcagaaaccgggcagc
C K A S Q S V S N D V A W Y Q Q K P G Q
gcgcgcgcgcctgctgattagctataaccagcagccgcctatggcgggcgtgccggatcgcctt
A P R L L I S Y T S S R Y A G V P D R F
agcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctgcaggcggaagat
S G S G S G T D F T L T I S S L Q A E D
gtggcgggtgtattattgccagcaggattataacagcccgccgacccttggccagggcacc
V A V Y Y C Q Q D Y N S P P T F G Q G T
aaagtggaaatttaaagaaccgaaaagcagcgcgataaaacccataaccctgcccgcgcgtgcccg
K V E I K E P K S S D K T H T C P P C P
ccgtgcccggcggcagcagcggcgggcggcagcggcgggcagcgcgcggaaccgcaggcg
P C G G G S S G G G S G G Q P R E P Q V
tataacctgcccgcgagccgcgaagaaatgacaaaaaccagggtgagcctgacctgcccg
Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L
gtgaaaggccttttatccgagcgcgatattgcgggtggaatgggaaagcaacggccagccggaa
V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E
aacaactataaaaccaaccccgccgggtgctggatagcgaaggcagcctttttctgtatagc
N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S

FIG. 56

aaactgaacgtggataaaaagccgctggcagcagggcaacgtgttagctgcagcgtgatg
K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M
catgaagcgcgtgcataaaccattatacccgagaaaagcctgagcctgagcccgggctga (SEQ ID NO: 153)
H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G Parada(SEQ ID NO: 121)

FIG. 56
continuación

ES 3 020 458 T3

IAB20M γ 1 EH3(M2) (VL-A9D, T10S, S12A, P15L, L21I, S22N; VH-Q1E, Q6E) (SEQ ID NO: 122)

atggaaaccgataccctgctgctgctgggtgctgctgctgctgggtgctggcagcacagga
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gagggtgcagctggaggagagcgcgctgaagtgaagaagcccggcgcagcgtgaagggtg
E V Q L V E S G A E V K K P G A S V K V
agctgcaaggccagcgctacagcttcacaggtactacatgcactgggtgagacaagcc
S C K A S G Y S F T G Y Y M H W V R Q A
cctggccagggcctcgagtggattggaaggatcaacccaacaacggagtgcactgtac
P G Q G L E W I G R I N P N N G V T L Y
aaccagaaattcaaggacagggtcaccatgaccgtggacaccagcatcagcacgcgcctac
N Q K F K D R V T M T V D T S I S T A Y
atggagctgtccaggtgaggagcgcacacccgctgtgtactactgcgccaggagcacc
M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R S T
atgatcaccaactacgtgatggattattggggccagggcacactggtgacagtgcgcagc
M I T N Y V M D Y W G Q G T L V T V S S
ggcagcaccagcggaggaggcagcggaggaggaagcggcggaggcggctcctccgatatc
G S T S G G G S G G G S G G G G S S D I
gtcatgaccagagccccgatagcctggccgtgagcctggggcagagagccaccatcaat
V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N
tgcaaggccagccagtcctgtgtccaacgcagctggcctggtatcaacagaagcccgccag
C K A S Q S V S N D V A W Y Q Q K P G Q
gctcctagctgctgatctcctacacagcagcaggtacgcgcggcgtgcctgataggttc
A P R L L I S Y T S S R Y A G V P D R F
agcggctccggcagcggcacagacttcaccctgacaatcagcagcctgcaagccgaagat
S G S G S G T D F T L T I S S L Q A E D
gtggcctgtactactgtcagcaggactacaactcccccccaccttcggccagggcaca
V A V Y Y C Q Q D Y N S P P T F G Q G T
aaggctcgagatcaaggagcccaagtcctccgacaagaccacacctgtccccctgcccc
K V E I K E F K S S D K T H T C P F C P
ccttgtggaggcgggaagcagcggaggcgggagcggaggacagccagagaaccccagggtg
P C G G G S S G G G S G G Q P R E P Q V
tataccctgccccctccaggaggagatgacaaaaaccagggtgagcctgacatgcctg
Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L
gtgaagggtcttctacccctccgacatcgccgtggagtgggaaagcaacggccagccccgag
V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E
aacaactacaagaccacaccccccgctgctggatagcgcaggctccttctttctgtacagc
N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S

FIG. 57

aagctgacogtggataaaaagcaggtggcagcaaggcaacogtgttctcctgctccgtcatg
K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M
cacgaggctctgcataaccactacacccaaaaatccctgagcctgagcccggtga (SEQ ID NO: 154)
H E A L R N R Y T Q K S L S L S F G Parada (SEQ ID NO: 122)

FIG. 57
continuación

IAB20M γ1 EH5 (M2) (VL-Q79E, V83E; VH-Q1E, Q6E) (SEQ ID NO: 123)

atggagacagacaccctcctcctgtgggtcctgctcctgtgggtgcccggatccacaggc
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gaggtccagctggtggaatccggagccgaggtgaagaaaaccggcgctcctgtaaagtc
E V Q L V E S G A E V K K P G A S V K V
tcttgcaaggcctccggctactccttcaccggctactacatgcactgggtgaggcaggcc
S C K A S G Y S F T G Y Y M H W V R Q A
cctggacagggactggaatggatcggcaggattaaccccaacaacggagtgaacctgtac
P G Q G L E W I G R I N P N N G V T L Y
aaccagaagttcaaggacagggtcaccatgacctggacaccagcatttcaccgcctac
N Q K F K D R V T M T V D T S I S T A Y
atggagctgtccaggctgagaagcgcgacaccgctgtgtactactgcgccaggagcacc
M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R S T
atgatcaccaactacgtgatggattattggggccagggcaccctcgtgacagtgcgcagc
M I T N Y V M D Y W G Q G T L V T V S S
ggatccacaagcggagcgggaagcggagcggcagcggcggcggcggcagcagcgataac
G S T S G G G S G G G S G G G G S S D I
gtgatgaccagagccccgccaccctgagcgtgagccccggcgaaagggccacactgagc
V M T Q S P A T L S V S P G E R A T L S
tgcaaggccagccagtcctcctccaaacgatgtggcctggaccagcagaagcccgacag
C K A S Q S V S N D V A W Y Q Q K F G Q
gcccctaggtcctcctgatcctcctacaccagctccaggtaacgcggcgtccctgacagattc
A P R L L I S Y T S S R Y A G V P D R F
tccggcagcggcagcggcaccgatttcaccctcaccatcagcagcctggaagccgaagat
S G S G S G T D F T L T I S S L E A E D
gaagctgtgtattactgccagcaggactacaacagccccccacatttggccagggaacc
E A V Y Y C Q Q D Y N S P P T F G Q G T
aaggtggagatcaaggagcccaagagcagcgcacaagaccataacctgccctccttgccct
K V E I K E P K S S D K T H T C P P C P
ccttgctcctcctgtggaggcgggaagctccggaggaggatccggaggccagcctagagag
P C P P C G G G S S G G G S G G Q P R E
ccccagggtgtacacctgccccctagcagggaggagatgaccaagaaccagggtgagcctg
P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L
acatgtctgtgtaagggtcttttaccacagcgacatcgccgtggagtgggagagcaacgyc
T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G
cagcctgagaacaactacaagaccaccctcctgtgctggactccgacggcagctttttc
Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F

FIG. 58

ctgtacagcaagctgacccgtggataaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttcagctgc
L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C
agcgtgatgcacgaggetctgcataaccactacacccagaagagccctgagccctgagccct
S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
ggatga (SEQ ID NO: 155)
G Parada (SEQ ID NO: 123)

FIG. 58
continuación

IAB20M γI EH5 (M2) (VL-A9D, T10S, S12A, P15L, L21I, S22N; VH-Q1E, Q6E) (SEQ ID NO: 124)

atggagacagacaccctcctcctgtgggtcctgtcctgtgggtgcccggtaccacaggc
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gaggccagctggtggaatccggagccgaggtgaagaaacccggcgccctccgtgaaagtc
E V Q L V E S G A E V K K P G A S V K V
tcctgcaaggcctccggctactccttcaccggctactacatgcactgggtgaggcaggcc
S C K A S G Y S F T G Y Y M H W V R Q A
cctggacagggactggaatggatcggcaggattaaacccaacaacggagtgaacctgtac
P G Q G L E W I G R I N P N N G V T L Y
aaccagaagttcaaggacaggggtcaccatgacccgtggacaccagcatttccaccgcctac
N Q K F K D R V T M T V D T S I S T A Y
atggagctgtccaggctgagaagcgacgacaccgctgtgtactactgcgccaggagcacc
M E L S R L R S D D C A V Y Y C A R S T
atgacaccaaactacgtgatggattattggggccagggcaccctcgtgacagtgagcagc
M I T N Y V M D Y W G Q G T L V T V S S
ggatccadaagcggaggcggaagcggaggcggcagcggcggcgggcagcagcgataac
G S T S C G C S C G C S G C C S S D I
gtgatgaccagagccccgattccctcgcctgagcctgggcgaaagggccacaatcaac
V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N
tgcaaggccagccagtcctgtctccaacgatgtggcctggtagcagcagaagcccgacag
C K A S Q S V S N D V A W Y Q Q K P G Q
gcccctaggctcctgatctcctacaccagctccaggtaacgcggcgctcctgacagattc
A P R L L I S Y T S S R Y A G V P D R F
tcggcagcggcagcggcaccgatttcaccctcaccatcagcagcctgcaggccgaggac
S G S G S G T D F T L T I S S L Q A E D
gtggctgtgtattactgccagcaggactacaacagccccccacatttggccagggaacc
V A V Y Y C Q Q D Y N S P P T F G Q G T
aagggtggagatcaaggagcccaagagcagcgacaagaccatacctgcctcctcgcct
K V E I K E P K S S D K T H T C P P C P
ccttgtcctccctgtggaggcggaagctccggaggaggatccggaggccagcctagagag
P C P P C G G G S S G G G S G G Q P R E
ccccaggtgtacacctgccccctagcaggaggagatgaccaagaaccaggtgagcccg
P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L
acatgtctgtgaagggttttaccacagcgacatcgccgtggagtgggagagcaacggc
T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G
cagcctgagaacaactacaagaccacccctccctgtgtggactccgacggcagccttttc
Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F

FIG. 59

ctgtacagcaagctgacccgtggataaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttcagctgc
L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C
agcgtgatgcacgaggctctgcataaccactacacccagaagagcctgagcctgagccct
S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
ggatga (SEQ ID NO: 156)
GParada (SEQ ID NO: 124)

FIG. 59
continuación

Alineamiento comparado IAB1M Y1 EH1 (M1) (SEQ ID NO: 125) frente a IAB1M Y1 EH3 (M1) (SEQ ID NO: 126), las diferencias se
 muestran en recuadros.
 IAB1M Y1 EH1 (M1) METDTLLLVLLLLWVTCSTEDIQLTQSPSTLSASVGRVTITCSASSSVRFIHWYQKPG 60
 IAB1M Y1 EH3 (M1) METDTLLLVLLLLWVPCSTCDIQLTQSPSTLSASVGRVTITCSASSSVRFIHWYQKPG 60
 IAB1M Y1 EH1 (M1) KAPKRLIYDESKLASGVSRPSSGSGSTDFILTISSLOQEDFATYYCQQWGSPPFTGQG 120
 IAB1M Y1 EH3 (M1) KAPKRLIYDTSKLASGVSRPSSGSGSTDFILTISSLOQEDFATYYCQQWGSPPFTGQG 120
 IAB1M Y1 EH1 (M1) TKVEIKGSTSGGSGGSGGSGGSEVOLVEYGGGLVQPGCSLRLSFAASGFNIKDYIHW 180
 IAB1M Y1 EH3 (M1) TKVEIKGSTSGGSGGSGGSGGSEVOLVEYGGGLVQPGCSLRLSFAASGFNIKDYIHW 180
 IAB1M Y1 EH1 (M1) VRQAPGKGLEWVAWIDPENGDTTFVPRFQGRATMSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYVC 240
 IAB1M Y1 EH3 (M1) VRQAPGKGLEWVAWIDPENGDTTFVPRFQGRATMSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYVC 240
 IAB1M Y1 EH1 (M1) KTGGEFWGGTLVTVSSSEPKS C DAKHTCP --- PGGGSGSGGSGGQPRPQVTFLEPSR DE 297
 IAB1M Y1 EH3 (M1) KTGGEFWGGTLVTVSSSEPKS S DKHTCP PCP PGGGSGSGGSGGQPRPQVTFLEPSR EE 300
 IAB1M Y1 EH1 (M1) L TKNQVSLTCLVKGYFPEVDIAVEWESNGQPENNNKTPPVLDSDGSFFLYSKLLTVCKSRW 357
 IAB1M Y1 EH3 (M1) M TKNQVSLTCLVKGYFPEVDIAVEWESNGQPENNNKTPPVLDSDGSFFLYSKLLTVCKSRW 360
 IAB1M Y1 EH1 (M1) QCGNVFSCSVMHAEALNHYTKQSLSLSPG K 387 (SEQ ID NO: 125)
 IAB1M Y1 EH3 (M1) QCGNVFSCSVMHAEALNHYTKQSLSLSPG - 389 (SEQ ID NO: 126)

FIG. 60

IAB1M y1 EH3 (M1) (SEQ ID NO: 126) las regiones CDR se definen por la definición de Chothia

atggagacccgataccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtgacctggaagcaacggc
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G

Secuencia de péptido señal

gacattcagctgacccagtcctctccacactgagcgctctcgtggggcgacaggggtcacaa
D I O L T O S P S T L S A S V G D R V T

VL

attacatgt tcgcctccagcagcggtcaggtttatccac tggatcagcagcagcccggo
I T C S A S S S V R F I H W Y Q Q R P G

LCDR1

aaggcccccaagagactgattctac gacacaagcaagctggcctcc ggagtgcccaagcaga
K A P K R L I Y D T S K L A S G V P S R

LCDR2

ttcagcgggcagcgggatccggccacgcgatttcacactgacacatcagcagcctgcagcccgaa
F S G S G S G T E F F L T I S S L Q P E
gaattcgccacctaactactctgc cagcagtggygggcctcctccccttcacc ttgggacagggc
D F A T Y Y C Q Q W G S S P F E L G Q G

LCDR3

accacaggtggagatcaag ggcctccacaagcggcgccggaagcggcgccgagcggcgccg

A K V E I K G S T S G G G S G G G S G G

Conector

gggggctccagc gaagtgcagctggtggagtacggcggcggactggtccagctggaggga
G G S S E V Q L V E Y G G G L V Q P G G

Conector vy

agcctgaggctgagctggcgccgctcc ggtttacatcaagattac tacatccactgg
S L R L S C A A S G F N I K D Y Y I H W

HCDR1

gtcagacagggccctggcnaaggccctggagtggtggcctggatc gatcccgagaacysa
V R Q A F G K G L E W V A W I D P E N G

HCDR2

gac	accgagttcgtgcccaagttccaggggaagagccaccatgagcgccgacaccagcaag
D	T E F V F K F Q G R A T M S A D T S K

HCDR2

aacacacggcctacctgcagatgaattccctcagggccgaggataccgcctggtactacgc
 N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
 aagaccggcggatttggggccaggggaaccttgggtgacctgcagotccgagcctaagagc
 K T G G F W G Q G T L V T V S S E P K S

FIG. 61

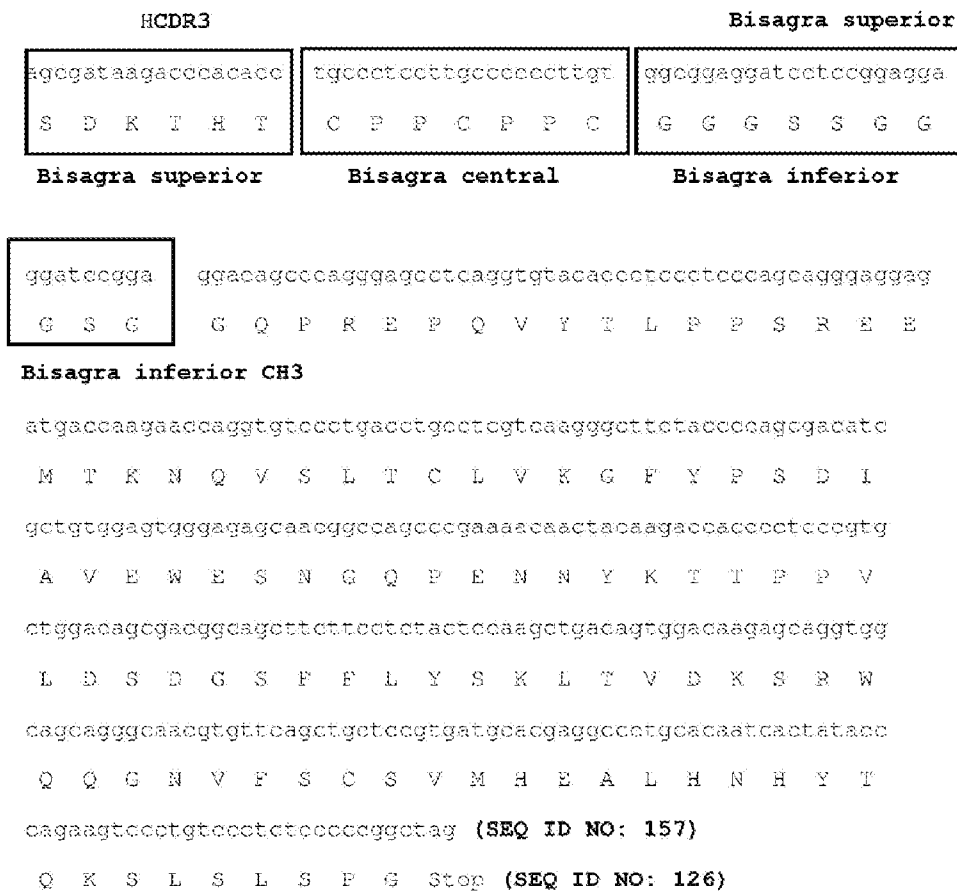


FIG. 61
continuación

IAB1M γ 2 EH2(M1) (SEQ ID NO: 127)

atggagaccgataccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtgctggcagcaccggc
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gacattcagctgacccagtcaccttcacactgagcgctccgtggcgacagggtcaca
D I Q L T Q S P S T L S A S V G D R V T
attacatgttccgctccagcagcgtcaggtttatccactgggtatcagcagaagcccggc
I T C S A S S S V R F I H W Y Q Q K P G
aaggccccaagagactgatctacgacacaagcaagctggcctccggagtgccagcaga
K A P K R L I Y D T S K L A S G V P S R
ttcagcggcagcggatccggcaccgatttcacactgaccatcagcagcctgcagcccgaa
F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E
gacttcgccacctactactgccagcagtggtggctcctcccccttcacctccggacagggc
D F A T Y Y C Q Q W G S S P F T F G Q G
accaaggtggagatcaagggtccacaagcggcgcggaagcggcgggcagcggcggc
T K V E I K G S T S G G G S G G G S G G
ggcggtccagcgaagtgcagctggtggagtacggcgggcgactggtccagcctggagga
G G S S E V Q L V E Y G G G L V Q P G G
agcctgaggtgagctgcgccgctccggctttaacatcaaagattactacattcactgg
S L R L S C A A S G F N I K D Y Y I H W
gtcagacaggccctggcaaaggcctggagtgggtggcctggatcgatcccagagaacgga
V R Q A P G K G L E W V A W I D P E N G
gadaccgagttcgtgcccagttccagggaagagccaccatgagcgcgacaccagcaag
D T E F V P K F Q G R A T M S A D T S K
aacaccgcctacctgcagatgaattccctcagggccgaggataccgctgtgtactactgc
N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
aagaccggcggtatgttggggccagggaaccctgggtgaccgtcagctccgagagaaagagc
K T G G F W G Q G T L V T V S S E R K S
tgctggagtgctcctccttgctccggcgaggatcctccggaggaggatccggaggacag
C V E C P P C P G G G S S G G G S G G Q
cccaggaggcctcaggtgtacacctccctccagcaggaggagatgaccaagaaccag
P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q
gtgtccctgacctgctcgtcaagggttctaccccagcgacatcgctgtggagtgggag
V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
agcaacggccagcccgaasacaactacaagaccaccctcccatgctggacagcgacggc
S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G
agcttcttctctactccaagctgacagtggaagagcaggtggcagcagggcaacgtg

FIG. 62

S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V
ttcagctgctccgtgatgcacgaggccctgcacacatcactatacccagaagtcctgtcc
F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S
ctctcccccgctag (SEQ ID NO: 158)
L S P G Parada (SEQ ID NO: 127)

FIG. 62
continuación

ES 3 020 458 T3

IAB1M γ1 EH5 (M1) (SEQ ID NO: 128)

attgaaaaccgataccctgctgctgtggtgctgctgctgctgggagcgccgagcagcagcgccg
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gatattcagctgacccagagcccgagcaccctgagcgcgagcgtggcgatcgcgctgacc
D I Q L T Q S P S T L S A S V G D R V T
attacctgcagcgcgagcagcagcgtgcgcttttatccattgggtatcagcagaaaaccgggc
I T C S A S S S V R F I H W Y Q Q K P G
aaagcgccgaaaacgcctgattttatgataccagcaaacctggcgagcggcgctgccgagccgc
K A P K R L I Y D T S K L A S G V P S R
tttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctgcagccggaa
F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E
gatttttgcgaccattatttgcagcagctggggcagcagcccgcttacctttggccagggc
D F A T Y Y C Q Q W G S S P F T F G Q G
accaaagtggaaattaaaggcagcaccagcggcgcgcgagcggcgcgagcggcgcgcc
T K V E I K G S T S G G G S G G G S G G
ggcggcagcagcgaagtgcagctggtggaatatggcggcgcgccggtgcagcggcgcgcc
G G S S E V Q L V E Y G G G L V Q P G G
agcctgcgcctgagctgcgcgcgagcggcctttaacattaaagattattatattcattgg
S L R L S C A A S G F N I K D Y Y I H W
gtgcgcagggcgccgggcaaaaggcctggaatgggtggcggtggaattgatccggaaaaacggc
V R Q A P G K G L E W V A W I D P E N G
gataccgaattttgtccgaaatttcaggggcgcgcgaccatgagcgcggataaccagcaaa
D T E F V P K F Q G R A T M S A D T S K
aacacgcgcgtatctgcagatgaacagcctgcgcgcggaagataccgcgggtgattattgc
N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
aaaaccggcgcgcttttggggccagggcaccctggtgacctgagcagcgaaccgaaaagc
K T G G F W G Q G T L V T V S S E P K S
agcgataaaaccataacctgcccgcgcgtgcccgccgtgcccgccgtgcggcgggcgcgagc
S D K T H T C P P C P P C P P C G G G S
agcggcgggcgcgagcggcgggccagccgcgcgaaccgcaggtgtataccctgcgcgcgagc
S G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P S
cgcgaaagaaatgacaaaaaccaggtgagcctgacctgcctgggaaaggcctttatccg
R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P
agcgatattgcgggtggaatgggaaagcaacgcgccagccggaaaaacaactataaaaccacc
S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
ccgcgcgggtgctggatagcgatggcagcctttttctgtatagcaaacctgacctgggataaa
P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K

FIG. 63

agccgctggcagcagggcaacgtgttttagctgcagcgtgatgcatgaagcgtgcataac
S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N
cattataccacagaaaagcctgagcctgagcccggtga (SEQ ID NO: 159)
H Y T Q K S L S L S P G Parada(SEQ ID NO: 128)

FIG. 63
continuación

IAB1M γ1 EH7(M1) (SEQ ID NO: 129)

atggaaaccgataaccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtgccgggcagcaccggc
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gatattcagctgacccagagcccgagcaccctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc
D I Q L T Q S P S T L S A S V G D R V T
attacctgcagcgcgagcagcagcgtgcgcctttattcattgggtatcagcagaaaccgggc
I T C S A S S S V R F I H W Y Q Q K P G
aaagcgcgaaacgcctgatttatgataccagcaaactggcgagcggcgtgccgagccgc
K A P K R L I Y D T S K L A S G V P S R
tttagcggcagcgcgagcggcaccgatattacccctgaccattagcagcctgcagccggaa
F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E
gatttttgcgacctattatttgcagcagcggggcagcagcccggtttacctttggccagggc
D F A T Y Y C Q Q W G S S P F T F G Q G
accaaagtggaaattaaaggcagcaccagcggcggcggcagcggcggcggcagcggcggc
T K V E I K G S T S G G G S G G G S G G
ggcggcagcagcgaagtgcagctggtggaatatggcggcggcctggtgcagccggcggc
G G S S E V Q L V E Y G G G L V Q P G G
agcctgcgcctgagctgcgcggcgcgagcggcctttaacattaaagattattatattcattgg
S L R L S C A A S G F N I K D Y Y I H W
gtgcgcaggcgcggggcaaaggcctggaatgggtggcgtggattgatccggaaaacggc
V R Q A P G K G L E W V A W I D P E N G
gataccgaatttgtgcgaaatttcaggggccgcgcgacccatgagcgcggataccagcaaa
D T E F V P K F Q G R A T M S A D T S K
aacaccgcgtatctgcagatgaacagcctgcgcgcgggaagataccgcgggtgtattattgc
N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
aaaaccggcggccttttggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcgaactgaaaacc
K T G G F W G Q G T L V T V S S E L K T
ccgctgggcgataaccaccataacctgcccgccgtgcccgccgtgcggcggcggcagcagc
P L G D T T H T C P P C P P C G G G S S
ggcggcggcagcggcggccagccgcgcgaaccgcaggtgtataacctgccgcgcgagccgc
G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P S R
gaagaaatgacccaaaaaccaggtgagcctgacctgcctggtgaaaggccttttatccgagc
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S
gatatttgcggtggaatgggaaagcaacggccagccggaaaaacaactataaaaccaccccg
D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
ccggtgctggatagcgatggcagctttttctgtatagcaaacctgaccgtggataaaagc
P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S

FIG. 64

```
cgctggcagcagggcaacgtgttagctgcagcgtgatgcctgaagcgtgcataaccat  
R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H  
tatacccagaaaagcctgagcctgagcccggtga (SEQ ID NO: 160)  
Y T Q K S L S L S P G Parada(SEQ ID NO: 129)
```

FIG. 64
continuación

ES 3 020 458 T3

IAB1M γ 1 EH8 (M1) (SEQ ID NO: 130)

atggaacccgataccctgctgctgtgggtgctgctgctgctgctggcgagcagcaggc
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
gatatttcagctgacctcagagcccgcagcacccctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtagcc
D I Q L T Q S P S T L S A S V G D R V T
attacctgcagcgcgagcagcagcgcgtgcgctttattcatctggatatcagcagaaaacccgggc
I T C S A S S S V R F I H W Y Q Q K P G
aaagcgcgccgaacgcctgatttatgataccagcaaacctggcgagcggcgctgccgagccgc
K A P K R L I Y D T S K L A S G V P S R
ctttagcggcagcgcgcagcggcacccgatcttacacctgaaccattagcagcctgcagccggaa
F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E
gattttgcgacctattattgcccagcagtggggcgagcagccccgtttacctttggccagggc
D F A T Y Y C Q Q W G S S P F T F G Q G
accaaagtggaaattaaaggcagcaccagcggcgcgcgagcggcgggcggcagcggcgggc
T K V E I K G S T S G G S G G S G G
ggcggcagcagcgaagtgcagctgggtggaatatggcggcggcctgggtgcagccggcgggc
G G S S E V Q L V E Y G G G L V Q P G G
agcctgcgcctgagctgcgcggcgagcggcctttaacattaagattattatattcattgg
S L R L S C A A S G F N I K D Y Y I H W
gtgcccagggcgccgggcaaggcctggaatgggtggcggtgattgatccggaaaaacggc
V R Q A P G K G L E W V A W I D P E N G
gataccgaatttgtgcgaaatttcaggggcgcgcgacccatgagcgcggataaccagcaaa
D T E F V P K F Q G R A T M S A D T S K
aacaccgcgtatctgcagatgaacagcctgcgcgcggaagataaccgcggtgtattattgc
N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
aaaaccggcggtctttggggccaggggcacccctggtagccgtgagcagcgaactgaaaacc
K T G G F W G Q G T L V T V S S E L K T
ccgctggcgataccacccataacctgcccgccgtgcccgccgtgcccgccgtgcggcgggc
P L G D T T H T C P P C P P C P P C G G
ggcagcagcggcgggcggcagcggcgccagccgcgcgaaccgcaggtgtataacctgccg
G S S G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P
ccgagccgcgaagaaaatgaccaaaaaccagggtgagcctgacctgcctggtgaaaggcttt
P S R E E M T K N Q V S L T C L V K C F
tataccgagcgatatattgcgggtggaatgggaaagcaacggccagccggaaaaacaactataaa
Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K
accaccccgccggtgctggatagcgatggcagcctttttctgtatagcaaacctgaccgtg
T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V

FIG. 65A

gataaaagcgcgtggcagcagggcaacgtgttttagotgcagcgtgatgcattgaagcgcgtg
D K S R W Q Q G N V P S C S V M H E A L
cataaccattatacccagaaaagcctgagcctgagcccggtga (SEQ ID NO: 161)
H N H Y T Q K S L S L S P G Parada(SEQ ID NO: 130)

FIG. 65A
continuación

IAB25M γ 2 NH (M1)

ATGGAAACCGACACCCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTCCCAGGCTCCACCGGT
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G

Péptido señal

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T

VL

CTCTCCTGCAAGTCCAGCTCAAGTGTAAAGTACATGAACCTGGTACCAACAGAAACCTGGC
L S C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K P G

LCDR1

CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGACACATCCAAACTGGCTTCCTGGAGTCCCTGCTCAC
Q A P R L L I Y D T S K L A S G V P A H

LCDR2

TTCAGGGGCAAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAA
F R G S G S G T D F T L T I S S L E P E

GATTTTGCAGTTTATTACTGTAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACCGTTCGGCCAAGGG
D F A V Y Y C Q Q W S S N P F T F G Q G

LCDR3

ACCAAGGTGGAAATCAAAAGGCTCCACATCCGGCGGAGGCTCTGGCGGTGGATCTGGCGGA
T K V E I K G S T S G G G S G G G S G G

Conector

GGCGGCTCATCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCC
G G S S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A

Conector

TCAGTGAAGTCTCCTGCAAGGCTTCCTGGATACACCTTCACCAGGTACACCATGCAGTGG
S V K V S C K A S G Y T F T R Y T M H W

HCDR1

GTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATACATTAAATCCTAGCCGTGGT
V R Q A P G Q G L E W M G Y I N P S R G

HCDR2

TATACTAATTACAATCAGAAAGTTCAAGGACAGGGTCACCATGACCACAGACACGTCCATC
Y T N Y N Q K F K D R V T M T T D T S I

HCDR2

AGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACCACACGGCCGTGTATTACTGT
S T A Y M E L S R L R S D D T A V Y Y C

GCGAGATATTATGATGATCATTACTCACTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACC
A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T L V T

HCDR3

GTCTCCTCAGAGCGCAAAATGTTGTGTGAGTGGCCACCGTGCCCAACACCACTGTGGCA
V S S E R K C C V E C P P C E A P P V A

Bisagra superior Bisagra xcentral

Bisagra inferior (LH)

EGACCGGGGAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG
G P G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M

(LH)

CH3

ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCC
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A

GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCATGCTG

FIG. 65B

V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q
CAGCGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (SEQ ID NO: 231)
K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 232)

FIG. 65B
continuación

IAB25M γ 2 EH (M1)

ATGGAGACCGACACCCTCCTCCTGTGGGTCTGCTGCTGTGGGTGCCTGGAAGCACCGGC
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G

Secuencia de Péptido Señal

GAGATTGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGAGCCTGTCCCCTGGAGAAAGAGCCACA
E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T
VL

CTGAGCTGTTCGCGCTCCTCCAGCGTGAGCTACATGAACCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGA
L S C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K P G

LCDR1

CAGGCTCCCAGGCTGCTCATCTACGACACAAGCAAGCTGGCTAGCGGCGTGCCCGCTCAT
Q A P R L L I Y D T S K L A S G V P A H

LCDR2

TTCAGAGGCAGCGGAAGCGGCACAGATTTTACCCTGACCAITTCCTCCCTGGAGCCTGAG
F R G S G S G T D F T L T I S S L E P E

GACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGTGGAGCTCCAACCCCTTCACATTCGGCCAGGGC
D F A V Y Y C Q Q W S S N P F T F G Q G

LCDR3

ACCAAGGTGGAAATCAAGGGATCCACAAGCGGAGCGCGGCAGCGCGCGGCAGCGGAGGC
T K V E I K G S T S G G G S G G G S G G

Conector

GGAGGCAGCAGCCAGGTGCAACTGGTGCAAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGAGCC
G G S S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A

Conector VH

AGCGTGAAGGTGTCTCTGCAAAGCCTCCGGATACACCTTCACCAGGTACACAATGCACTGG
S V K V S C K A S G Y T F T R Y T M H W

HCDR1

GTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGACTGGATGGGATACATCAACCCAGCAGGGGC
V R Q A P G Q G L E W M G Y I N P S R G

HCDR2

TACACCAACTATAACCAGAAGTTCAAGGACAGGGTGACCATGACCACCGACACCAGCATT
Y T N Y N Q K F K D R V T M T T D T S I

HCDR2

TCCACCGCTTATATGGAGCTCAGCAGACTGAGGTCCGACGACACCGCCGTGTACTACTGC
S T A Y M E L S R L R S D D T A V Y Y C

GCCAGGTATTACGACGACCACTACAGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACC
A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T L V T

HCDR3

GTGTCCAGCGAGAGGAAGTGCTGCGTGGAATGTCCCCCTTGCTCCTGGAGGCGGAAGCTCC
V S S E R K C C V E C P P C P G G G S S

Bisagra superior Bisagra central

Bisagra inferior

GGAGGAGGATCCGGCGGACAGCCCAGGGAACCTCAGGTGTACACCTGCCCGCCAGCAGG
G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P S R

Bisagra inferior

CH3

GAGGAGATGACAAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCAGC
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S

FIG. 65C

GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCC
D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P

CCTATGCTGGATAGCGACGGCAGCTTCTTCCGTACTCCAAGCTCACCGTGGATAAGAGC
P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S

AGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC
R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H

TACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCCGGCAAG (SEQ ID NO: 233)
Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 234)

FIG. 65C
continuación

Secuencia variable pesada de IAB22M (VH-K67R)

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHFVRQAPGKGLEWIGRIDP
ANDNTLYASKFQGRATISADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCGRGYGYVFD
HWGQGTLLVTVSS (**SEQ ID NO: 99**)

FIG. 66

ligera variable de IAB20 (VL-Q79E, V83E)
 VL
 DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSNDVAWYQQKPGQAPRLLISYTSRY
 AGVPDRFSGSGGTDFLTISSLAEDEAVYYCQQDYNPPPTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO: 100)

ligera variable de IAB20 (VL-A9D, T10S, S12A, P15L, L21I,
 S22N)
 VL
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQAPRLLISYTSRY
 AGVPDRFSGSGGTDFLTISSLQAEDVAWYCCQQDYNPPPTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO: 101)

FIG. 67

pesada variable de IAB20 (VH-Q1E, Q6E)
VH
EVQLVESGAENVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYIMHWVRQAPGQGLEWIGRINP
NNGVTLYNQKFKDRVTMTVDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARSTMITNYV
MDYWGQGTLVTVSS (**SEQ ID NO: 102**)

FIG. 68

secuencia ligera variable anti-CD3 (VL, R62S)
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASSSVSYMNWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGVP
 AHFSGSGTDEFTLTISSEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKVEIK **(SEQ ID**

NO: 103)

secuencia pesada variable anti-CD3 (VH, Q1E, Q6E)
 EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSRGYT
 NYNQKFKDRVTMTTDSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARYYDDHYSLDYWGGTTLVT
 VSS **(SEQ ID NO: 104)**

FIG. 69

PSMA (Antígeno de membrana específico de la próstata), Glutamato carboxipeptidasa 2, Homo sapiens
UniProtKB/SwissProt: Q04609 (SEQ ID NO: 131)

MWNLLETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGELFGWFIKSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENI
 KKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAQIQSQWKEFGLDVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIEN
 TSLFEPPPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARYGKVFR
 GNKVNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYDPDGWNLPGGGVQQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYR
 RGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLLEKMGSAPDSSWRGSLKVPYNVGPFGFTGNFSTQKVKMHIHSTN
 EVTRIYNVIGTLRGAVEPDYVILGGHRDSWVEGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFAS
 WDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCPTPLMYSLVHNLTKEKSPDEGFE
 KSLYESWTKKSPSPESGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWEETNKFSGYPLYHVSYYEYE
 LVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFEANSLVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSSMKHPQEMKTYSVSFD
 SLFSVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHHVIYAPSSHNKY
 AGESFPFGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVQRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA **(SEQ ID NO: 131)**

FIG. 70

PSCA (Antígeno de células madre de la próstata), Homo sapiens
UniProtKB/SwissProt: O43653 (SEQ ID NO: 132)

MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDCLQVENC TQLGEQCWTARIRAVGLLTVISKGCSLNC
VDDSQDYVVGKKNITCCD TDL CNASGAHALQPAAAILALLPALG LLLWGP GQL **(SEQ ID NO: 132)**

FIG. 71

**glicoproteína de trofoblastos oncofetales 5T4 (gie5T4 I 435655 I e5t4, Homo sapiens
UniProtKB/SwissProt: Q13641 (SEQ ID NO: 133))**

MPGGCSRGPAAGDGRLRLARLALVLLGWVSSSPTSSASSFSSSAFFLASAVSAQPPLEPDQCPALCECSE
AARTVKCVNRNLTEVPTDLPAYVRNLF LTGNQLAVLPAGAFARRPFLAELAAALNLSGSRLDEVVRAGAFEH
LPSLRQLDLSHNPLADLSPFAFSGSNASVSAPSPVELILNHI VPPEDERQNRSEFGMVVAALLAGRALQ
GLRRLELASNHFLYLPRDVL AQLP SLRHLDSLNNSLVSLTYVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLAE
LQGLPHIRVFLDNNPWVCDCHMADMVTLKETEVVQKGDRLTCAYPEKMRNRVLLLENSADLDCDPILPP
SLQTSYVFLGIVLALIG AIFLLVLNLNRKG I KKMWNIRDACRDHMEGYHYRYEINADPRLTNLSSNSDV
(SEQ ID NO: 133)

FIG. 72

Cadena alfa de la glicoproteína de superficie de células T CD8 , Homo sapiens

UniProtKB/SwissProt: P01732 (SEQ ID NO: 134)

MALPVTALLPLALLHAARPSQFRVSPDLRTWNLGETVELKQCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTEL
 LYLSONKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTT
 PAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRN
 RRRVCKCPRPVVKSGDKPSSLARYV (SEQ ID NO: 134)

FIG. 73

Cadena beta de la glicoproteína de superficie de células T CD8 , Homo sapiens

UniProtKB/SwissProt: P10966 (SEQ ID NO: 135)

MRPRLWLLAAQLTVLHGNSVLQQTFPAYIKVQTNKVMVLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHFFLALWDSAK
GTIHGEEVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRV
CRLPRPETQKGPLCSPVTLGLLVAGVLVLLVSLGVAMHLCCRRRRARLRFMKQFYK **(SEQ ID NO: 135)**

FIG. 74

**Cadena delta de la glicoproteína de superficie de células T CD3 , Homo sapiens
UniProtKB/SwissProt: P04234 (SEQ ID NO: 136)**

MEHSTFELSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPNGI
YRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQ
ALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO: 136)

FIG. 75

Cadena gamma de la glicoproteína de superficie de células T CD3 , Homo sapiens
UniProtKB/SwissProt: P09693 (SEQ ID NO: 137)

MEQKGGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVVDYQEDGSLVLLTCDAEAKNITWEKDGKMIGFLTEDEKK
KWNLGSAKDPGRMYQCKGSKFLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVVYFIAGQD
GVRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDRDDQYSHLQGNQLRRN **(SEQ ID NO: 137)**

FIG. 76

Cadena épsilon de la glicoproteína de superficie de células T CD3
UniProtKB/SwissProt: P07766 (SEQ ID NO: 138)

MQSGTHWRVL GLCLLSVGVM GQDGNEEMGG ITQTPYKVS I SGTIVILTCP
 QYPGSEILWQ HNDKNIGGDE DDKNIGSDED HSLKEFSEL EQSGYYVCYP
 RGSKPEDANF YLYLRARVCE NCMEMDVMSV ATIVIVDICI TGGLLLVYY
 WSKNRKAKAK PVTRGAGAGG RQRGQNKERP PPVNPDPYEP IRKGQRDLYS
 GLNQRR I (SEQ ID NO: 138)

FIG. 77

Cadena zeta de la glicoproteína de superficie de células T CD3 , Homo sapiens
UniProtKB/SwissProt: P20963 (SEQ ID NO: 139)

MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF
 LRVKFSRSAD APAYQQGQNQ LYNELNLGRR EEYDVLDKRR GRDPFMGGKP
 QRRKNPQEG L YNELQKDKMA EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK
 DTYDALHMQA LPPR **(SEQ ID NO: 139)**

ES 3 020 458 T3

FIG. 78

IAB25M γ 2 EH2 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) de IAB25
EIVLTQSPATLS¹SPGERATLSCSASSSVSYMNWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGVPAHFRGSGGTDFTLTISSELEPE
DFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)

Conector
GSTSGGGGGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) de IAB25
QVQLVQSGAEVKKPGASVKV'SCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSRGYTNYNQKFKDRVTMTTDTSSIS
TAYMELSR¹LRSDDTAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 20)

Bisagra completa (EH2)
ERKSCVECP¹PCPGGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 34)

Bisagra superior
ERK (SEQ ID NO: 47)

Bisagra central
SCVECP¹PCP (SEQ ID NO: 56)

Bisagra inferior
GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG2 humana
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS¹DSGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QG¹NVFSCSV¹MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

CH3 T26S, L28A, M57V de IgG2 humana
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV¹MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 181)

CH3 T26W de IgG2 humana
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV¹MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 182)

FIG. 79

IAB20M γ 2 EH2 (de N- a C-terminal)

Secuencia ligera variable (VL) anti-5T4

DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVNDVAWYQQKPGQAPRLLISYTSRRYAGVDPDRFSGSGGTDFLTITSLQA
EDVAVYYCQDYNPPTFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 17)

Conector

GSTSGGGGGGGGGSS (SEQ ID NO: 62)

Secuencia pesada variable (VH) anti-5T4

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYSTGYMHWRQAPGGGLEWIGRINPNNGVTLYNQKFKDRVTMTVDTSIST
AYMELSRRLRSDDTAVYYCARSTMITNYMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 18)

Bisagra completa (EH2)

ERKSCVECPPCPGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 34)

Bisagra superior

ERK (SEQ ID NO: 47)

Bisagra central

SCVECPPCP (SEQ ID NO: 56)

Bisagra inferior

GGGSGGGSG (SEQ ID NO: 59)

CH3 de IgG2 humana

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

CH3 T26S, L28A, M57V de IgG2 humana

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPYLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 181)

CH3 T26 W de IgG2 humana

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 182)

FIG. 80