

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 676**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2007 E 07725501 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2027153**

54 Título: **Complejos moleculares diméricos**

30 Prioridad:

25.05.2006 US 808840 P

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

18.06.2014

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
(100.0%)
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim, DE**

72 Inventor/es:

**HEITNER, TARA;
LIGHT, DAVID;
MCLEAN, KIRK;
PARRY, RENATE;
SATOZAWA, NOBORU;
SCHNEIDER, DOUGLAS y
SETO, MARIAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 469 676 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

Complejos moleculares diméricos

Resumen de la invención

5 La presente invención proporciona complejos moleculares diméricos que comprenden una primera y segunda proteína de fusión, en los que cada proteína de fusión comprende de su extremo N a C (a) un resto efector biológico, (b) una región bisagra de una molécula de IgG unida al resto efector biológico y (c) un dominio de dimerización CH4 de una molécula de IgE covalentemente unido a la región bisagra, en los que el complejo molecular comprende un enlace disulfuro entre un residuo de cisteína en la región bisagra de la primera proteína de fusión y un residuo de cisteína en la región bisagra de la segunda proteína de fusión.

10 Restos efectores biológicos preferidos son un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab, un dominio extracelular de un receptor de membrana de tipo I, una citocina, una quimiocina, una enzima, una toxina o un marcador detectable. Restos efectores biológicos más preferidos son un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab, una toxina o un marcador detectable.

15 En una realización, el complejo molecular dimérico de la invención comprende dos proteínas de fusión que comprenden cada una restos efectores biológicos idénticos. En otra realización, las dos proteínas de fusión dentro del complejo comprenden cada una diferentes restos efectores biológicos. En una realización preferida, los restos efectores biológicos son sitios de unión al antígeno, con tanto las mismas especificidades de unión como diferentes.

20 Cada proteína de fusión comprende una región bisagra que comprende los residuos de aminoácidos 223 a 243 de SEC ID N°: 25, en la que las posiciones 240-243 están ocupadas por el tetrapéptido VFLF. En realizaciones preferidas, el tetrapéptido VFLF se sustituye con un tetrapéptido seleccionado del grupo que consiste en DSEY, KSKY, DEEY y KRKY. Son más preferidas realizaciones en las que el tetrapéptido es DSEY o KSKY.

En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión que comprenden los complejos moleculares diméricos. En una realización, una molécula de ácido nucleico codifica la proteína de fusión de SEC ID N°: 1.

25 En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen los complejos moleculares diméricos objeto.

Breve descripción de las figuras

30 **FIGS. 1A-D.** Dibujos esquemáticos de diversos complejos moleculares diméricos. En cada caso, enlaces disulfuro se forman entre las cisteínas en la región bisagra de las proteínas de fusión que comprenden el complejo. **FIG. 1A**, un complejo molecular dimérico en el que el resto efector biológico es un anticuerpo monocatenario. **FIG. 1B**, dos complejos moleculares diméricos monoespecíficos en los que el resto efector biológico es un fragmento Fab; los complejos se diferencian entre sí en la secuencia usada para sustituir el tetrapéptido VFLF "natural" dentro de la bisagra. **FIG. 1C**, un complejo molecular dimérico biespecífico en el que los restos efectores biológicos son dos fragmentos Fab diferentes y en el que cada proteína de fusión comprende además una variante de corte y empalme de IgE M2" diferente en su extremo C (SEC ID N°: 26 y 27). **FIG. 1D**, un complejo molecular dimérico en el que el resto efector biológico es un dominio extracelular de un receptor de membrana de tipo I.

40 **FIG. 2.** Esquema que muestra la generación del anticuerpo monocatenario 19G9scFv. Las regiones VH y VL se amplificaron por PCR usando cebadores que introdujeron sitios de restricción y sitios para solapar la extensión del ligador de GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID N°: 8). Tras 15 ciclos de extensión, scFv se amplificó con los cebadores directos e inversos originales mostrados durante 35 ciclos y luego se clonó por digestión con restricción en el vector de expresión bacteriano pz613. Cebador directo de VH, SEC ID N°: 15; cebador inverso de VH, SEC ID N°: 16; cebador directo de VL, SEC ID N°: 17; cebador inverso de VL, SEC ID N°: 18.

45 **FIG. 3A-B.** Esquemas que muestran la construcción de construcciones del dominio de dimerización CH4 de IgE usadas para preparar el complejo molecular dimérico que contiene el anticuerpo monocatenario 19G9scFv. **FIG. 4A**, construcción de un dominio de dimerización CH4 de IgE fusionado con una bisagra de IgG1. Cebador de ATG001, SEC ID N°: 9; cebador de ATG003, SEC ID N°: 11; cebador de ATG004, SEC ID N°: 12; cebador de ATG006, SEC ID N°: 13. **FIG. 4B**, construcción de un dominio de dimerización CH4 de IgE fusionado con una bisagra de IgG con cuatro aminoácidos mutados para crear una bisagra más hidrófila (cebador de ATG019, SEC ID N°: 14). La inserción muestra la secuencia alrededor del sitio de mutación que incluye tanto la secuencia de aminoácidos, aminoácidos 252-281 de SEC ID N°: 1, como la secuencia de nucleótidos (nucleótidos 783-869 de SEC ID N°: 2).

50 **FIGS. 4A-B.** Secuencias de dos proteínas de fusión 19G9scFv. **FIG. 5A**, la secuencia de aminoácidos en la parte

inferior (SEC ID N°: 3) y la secuencia de ácidos nucleicos en la parte superior (SEC ID N°: 4) de la proteína de fusión 19G9scFv "natural" contienen las regiones VH, cursiva negrita; ligador de scFv, cursiva negrita subrayado; extensión de VL y del extremo C, negrita; bisagra de IgG, cursiva, con tetrapéptido "natural" subrayado en negrita; CH4 de IgE, sencillo; marca de epítipo del extremo C, subrayado cursiva. **FIG. 5B**, la secuencia de aminoácidos en la parte inferior (SEC ID N°: 1) y secuencia de ácidos nucleicos en la parte superior (SEC ID N°: 2) de la proteína de fusión 19G9scFv "mutante" contiene las regiones VH, cursiva en negrita; ligador de scFv, cursiva en negrita subrayado; extensión de VL y del extremo C, negrita; bisagra de IgG, cursiva, con sustitución de tetrapéptidos hidrófilos subrayado en negrita; CH4 de IgE, sencillo; marca de epítipo del extremo C, subrayado cursiva.

FIG. 5A-B. Caracterización de un complejo molecular dimérico purificado que comprende dos proteínas de fusión que contienen el anticuerpo monocatenario 19G9scFv (algunas veces denominado complejo molecular dimérico 19G9scFv). **FIG. 6A**, perfil de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), que indica que la proteína pura es principalmente un dímero (~90 kDa basado en tiempos de elución de patrones de peso molecular). **FIG. 6B**, el análisis de SDS-PAGE de proteína de fusión 19G9scFv no reducida (carriles 2 y 3, que contienen 2 µl y 5 µl de proteína, respectivamente) y proteína de fusión 19G9scFv reducida (carriles 5 y 6, que contienen 2 µl y 5 µl de proteína, respectivamente) está de acuerdo con el peso molecular calculado del complejo dimérico (85,4 kDa) y del monómero de la proteína de fusión 19G9scFv (42,7 kDa). Los carriles 1 y 7 contienen marcadores de peso molecular.

FIG. 6. Gráfica que muestra datos de ELISA del complejo molecular dimérico 19G9scFv purificado (triángulos blancos) que se une a proteína BHK-RG-1 en comparación con la unión del diacuerpo 19G9 correspondiente (cuadrados rellenos). Gran parte de la secuencia del diacuerpo 19G9 es similar a la secuencia de 19G9 scfv (aminoácidos 1-251 en SEC ID N°: 1). Sin embargo, el ligador entre los dominios VH y VL en el diacuerpo solo tiene 5 aminoácidos en longitud (GGGGS).

FIG. 7. Diagrama del vector pPEP MF-J DSEY2 usado para expresar el complejo de dímeros de Fab, como se muestra esquemáticamente en la FIG. 1B.

FIG. 8. Bio-distribución *in vivo* del complejo molecular dimérico 19G9scFv en comparación con otros formatos de anticuerpo (IgG de 19G9, anticuerpo monocatenario scFv monomérico 19G9 y diacuerpo 19G9). El eje Y representa el porcentaje promedio de dosis inyectada por gramo (% medio de DI por gramo) para cuatro tejidos: sangre (S), tumor (T), hígado (H) y riñón (R). Los valores se muestran para tejidos recogidos 0,25, 3, 6 y 48 h tras la inyección de 2 µCi de anticuerpo marcado con ¹¹¹In por animal. El % de DI por gramo para la muestra tumoral de 48 h se indica con una flecha. Mientras que el tumor se marca bien por tanto el complejo molecular dimérico 19G9 scFv como IgG de 19G9, un alto porcentaje de IgG de 19G9 también es retenido en la sangre 48 h, a diferencia del complejo molecular dimérico. scFv y el diacuerpo no marcan bien el tumor y también producen una acumulación de marca en los riñones.

FIG. 9. Esquema que muestra la generación del plásmido pIE-J_DSEY usado para expresar la proteína de fusión J_DSEY, como se describe en el Ejemplo 5.

FIG. 10. Unión del complejo molecular dimérico J_DSEY a la proteína de antígeno biotinilado para la proteína ABJ de anticuerpo en comparación con la unión de la forma Fab de ABJ. El complejo molecular dimérico J_DSEY y la forma Fab de ABJ tienen actividad equivalente, con una CE₅₀ que es aproximadamente nanomolar. Estudios previos que comparan formas de Fab monomérico y de IgG₅₀ de ABJ en ensayos similares muestran que los anticuerpos monoméricos y diméricos se unen a concentraciones similares. Las concentraciones de anticuerpo se calcularon basándose en pesos moleculares de 125 kD para el complejo molecular dimérico, 50 kD para Fab y 150 kD para IgG. El anticuerpo secundario usado en el ensayo fue HRP-anticuerpo anti-Fab humano (Jackson ImmunoResearch).

FIG. 11. Análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Tanto el complejo molecular dimérico J_DSEY como la expresión heterogénea de J_DSEY y J_KSKY dieron el pico principal a aproximadamente 125 kD, sugiriendo la formación del complejo dimérico. El complejo molecular dimérico J_KSKY también mostró un pico a aproximadamente 125 kD, aunque no es el pico principal.

FIG. 12. Análisis de masas de MALDI-TOF. El complejo dimolecular J_DSEY (0,26 mg/ml) se mezcló con 10 mg/ml de matriz de MALDI de ácido sinapínico en 50 % de acetonitrilo, 0,1 % de TFA a una relación entre 1:1 y 1:5 y 1 pmol de proteína mínima se eligió como diana por mancha. El análisis de masa de MALDI-TOF se realizó usando un instrumento Bruker UTT calibrado linealmente con patrones II de proteína Bruker. Se registraron espectros de iones positivos con un potencial de aceleración de 25 kV para 100 disparos de láser, acumulados durante 15 eventos. La masa molecular indicada de 123.962,2 Da está de acuerdo con el peso molecular esperado para el complejo molecular dimérico de Fab J_DSEY intacto y está de acuerdo con la SEC y masa calculada.

FIG. 13. Unión del complejo molecular dimérico 25_DSEY a proteína de antígeno biotinilado para tanto el anticuerpo AB25 (mismo que el antígeno para ABJ anterior) en comparación con la unión de la forma de Fab de AB25 como la forma de IgG de AB25. La actividad de unión del complejo molecular dimérico (25_DSEY) mejoró en comparación con la de Fab, y equivalente a la unión encontrada con la forma de IgG. La CE_{50} para el dímero de Fab dimérico 25_DSEY y la IgG están ambas en el intervalo sub-nanomolar. Estudios previos que comparan las formas de Fab monomérico y de IgG dimérica de AB25 en ensayos similares muestran que la IgG dimérica se unió con mayor afinidad que Fab monomérico, de acuerdo con estos resultados. La concentración de anticuerpo se calculó basándose en pesos moleculares de 125 kD para el complejo molecular dimérico, 50 kD para Fab y 150 kD para IgG. El mismo HRP-anticuerpo anti-Fab humano como se muestra en el Ejemplo 6 se usó como anticuerpo secundario.

Descripción detallada de la invención

La invención explota las propiedades de auto-dimerización del dominio CH4 de IgE para proporcionar complejos moleculares diméricos que comprenden restos efectores biológicos. Un "resto efector biológico" es un polipéptido que comprende la porción biológicamente activa de moléculas tales como anticuerpos, receptores de membrana de tipo I y tipo II, citocinas, enzimas, y similares. Restos efectores biológicos útiles incluyen anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, dominios extracelulares de receptores de membrana de tipo I o tipo II, citocinas (incluyendo quimiocinas), dominios de sitios activos de enzimas, hormonas de proteína y moléculas efectoras de péptidos.

Los restos efectores biológicos en cada una de las dos proteínas de fusión que comprenden un complejo molecular dimérico pueden ser idénticos o pueden ser restos con dos funciones diferentes (por ejemplo, un sitio de unión al antígeno y una toxina). Restos efectores biológicos que tienen una función terapéutica útil o dirigida específicamente a tejido son especialmente útiles.

Las regiones constantes de inmunoglobulinas se fusionan frecuentemente con restos biológicamente activos para crear proteínas quiméricas. La configuración de la fusión y los dominios de inmunoglobina varían dependiendo de la función prevista. Por ejemplo, el documento WO 2005/017148 desvela una construcción que contiene una región variable monocatenaria (scFV) fusionada con una bisagra de IgG mutante, en la que se han sustituido las cisteínas que forman disulfuro y los dominios CH3-CH4 de IgE. La construcción resultante es monomérica. M. Ochino y col. (International Journal of Molecular Medicine, vol 14, nº 3, 2004, pág. 383-388) también muestran una fusión entre scFV y el dominio CH4 de IgE. Esta construcción carece de la región bisagra flexible presente en inmunoglobulinas tales como IgG. Bestagno y col. (Biochemistry, vol 40, nº 25, 2001 pág. 10696-10692) presentan otro ejemplo de una construcción de fusión dimérica basada en la familia de IgE que carece de una región bisagra flexible.

Los complejos moleculares diméricos son estables *in vivo* y se unen a una diana de interés con una afinidad similar a la de la molécula nativa de la que se deriva el resto efector biológico.

Los complejos moleculares diméricos de la invención comprenden dos proteínas de fusión. En algunas realizaciones, cada proteína de fusión comprende lo siguiente, del extremo N a C: (a) un resto efector biológico, (b) una región bisagra de una molécula de IgG unida al resto efector biológico; y (c) un dominio de dimerización CH4 de IgE covalentemente unido a la región bisagra. La dimerización de los dominios de dimerización CH4 de la primera y segunda proteínas de fusión se produce por formación de enlaces disulfuro entre cisteínas en la región bisagra de cada proteína de fusión. Véanse las **FIG. 1A-D**.

La molécula efectora puede estar covalentemente unida directamente a la secuencia nativa de la bisagra de IgG₁. En otras realizaciones puede emplearse un aminoácido ligador. En tales realizaciones, la molécula efectora está unida covalentemente al ligador, que está unido covalentemente a la bisagra de IgG₁. La bisagra de IgG es preferentemente una bisagra de IgG₁, preferentemente derivada de IgG₁ humana, aunque pueden usarse regiones bisagra de IgG₁ de otras especies (por ejemplo, ratón, conejo, etc.). En otras realizaciones pueden usarse regiones bisagra de otras IgG (por ejemplo, IgG₂, IgG₃ e IgG₄).

La bisagra de IgG₁, como se usa en el presente documento, comprende los residuos de aminoácidos 223 a 243 de dentro de la primera cadena beta del dominio CH2 de IgG₁, en los que la numeración se basa en la secuencia de la cadena pesada de IgG₁ de Eu (SEC ID Nº: 25) como se describe por Edelman y col. (1969) Proc. Natl. Acad. Science USA, 63, pág. 78 - 85. Esta secuencia contiene un tetrapéptido hidrófobo, VFLF, en las posiciones 240-243 (correspondientes a las posiciones 277-280 en SEC ID Nº: 3). En una realización preferida, este tetrapéptido hidrófobo está sustituido con un tetrapéptido de aminoácidos hidrófilos, Asp, Ser, Glu y Tyr (DSEY) (residuos de aminoácidos 277-280 en SEC ID Nº: 1), para aumentar la solubilidad. Las secuencias de CH2 bisagra y del extremo N de IgG₂, IgG₃ o IgG₄ también contienen el tetrapéptido VFLF y, por tanto, las regiones bisagra de estas moléculas de inmunoglobulina proporcionan las mismas oportunidades de sustitución en estas posiciones.

En otra realización pueden hacerse modificaciones en la región bisagra para aumentar la capacidad para conjugar diversas moléculas con el complejo molecular dimérico. Aunque los residuos de lisina ya presentes en el dímero

pueden usarse para la conjugación, sitios adicionales para la conjugación pueden proporcionarse alterando el mismo tetrapéptido hidrófobo (es decir, VFLF, en las posiciones 277-280 en SEC ID N°: 3) que se cambió a DSEY (produciendo SEC ID N°: 1) a, por ejemplo, el tetrapéptido, KSKY. Los residuos de lisina adicionales proporcionados por esta sustitución pueden usarse para añadir poliglicoles (por ejemplo, PEG, POG) a una molécula dimerizada para mejorar la eliminación. Alternativamente, moléculas tales como toxinas, marcas detectables, moléculas radiactivas, etc., pueden conjugarse con proteínas de fusión del complejo molecular dimérico mediante estos residuos de lisina. Los procedimientos de conjugación son muy conocidos en la técnica.

Complejos moleculares diméricos usando anticuerpos como efector biológico

Restos

Dímeros de scFv y Fab

Los complejos moleculares diméricos de la invención pueden formarse usando proteínas de fusión que comprenden anticuerpos como restos efectores biológicos. En algunas realizaciones, los restos efectores biológicos de cada proteína de fusión comprenden sitios de unión al antígeno. Los sitios de unión al antígeno pueden proporcionarse, por ejemplo, por un anticuerpo monocatenario (scFv) o un fragmento Fab. El complejo molecular dimérico resultante comprenderá dos sitios de unión al antígeno, que pueden ser de especificidades iguales o diferentes (es decir, que forman complejos moleculares diméricos mono-específicos o bis-específicos, respectivamente).

Un complejo molecular dimérico mono-específico en el que el resto efector biológico en ambas proteínas de fusión es un anticuerpo monocatenario se muestra esquemáticamente en la **FIG. 1A**. La **FIG. 1B** es una representación esquemática de complejos moleculares diméricos mono-específicos en los que el resto efector biológico en cada proteína de fusión es un fragmento Fab (es decir, "dímero de Fab"). La **FIG. 1C** es una representación esquemática de un complejo molecular dimérico bis-específico en el que los restos efectores biológicos en las proteínas de fusión son fragmentos Fab con especificidades diferentes.

Los complejos moleculares diméricos relacionados con anticuerpos de la invención tienen perfiles farmacocinéticos y de biodistribución superiores cuando se comparan con los de anticuerpos monocatenarios monoméricos, diacuerpos, o IgG dimericas de tamaño completo. Cuando se comparan con un anticuerpo IgG completo, los complejos moleculares de la invención proporcionan una mayor relación de concentración en tumor con respecto a sangre en un momento de tiempo más temprano después de la administración *in vivo* y muestran mejor penetración en un tumor. Tales complejos también muestran una mayor acumulación en el tumor con menos acumulación en el riñón en comparación con tanto anticuerpos monocatenarios monoméricos como diacuerpos (véase la **FIG. 8**).

Los complejos moleculares diméricos relacionados con anticuerpos de la invención pueden usarse diagnósticamente y terapéuticamente. Por ejemplo, un complejo molecular dimérico puede usarse para la obtención de imágenes *in vivo*, tal como obtención de imágenes de PET, o para diagnósticos *in vitro*. Cuando se conjuga con una molécula terapéutica, un complejo molecular dimérico puede usarse para dirigir la molécula terapéutica a una diana particular.

En una realización preferida, las dos proteínas de fusión dentro del complejo dimérico comprenden cada una anticuerpos monocatenarios ligados al dominio CH4 de IgE mediante la región bisagra y aminoácidos del extremo N que incluyen una porción de la primera hoja β del dominio CH2 de IgG1 humana. El beneficio de esta unión es que los enlaces disulfuro entre las dos proteínas de fusión se localizarán en el centro del complejo molecular dimérico, estabilizando así el complejo. Tales complejos moleculares diméricos normalmente tienen un peso molecular entre 50 kD y 150 kD.

Un ejemplo de una proteína de fusión que contiene scFv usada en un complejo dimérico de la invención es SEC ID N°: 1 (FIG. 5B), que contiene el anticuerpo monocatenario 19G9scFv.

La región bisagra en esta proteína de fusión THTCPPEPPELLGGPSDSEY (SEC ID N°: 5; residuos de aminoácidos 260-280 de SEC ID N°: 1) contiene el tetrapéptido hidrófilo 'DSEY' en los residuos de aminoácidos 277-280, en lugar del tetrapéptido 'VFLF' "natural" (residuos de aminoácidos 277-280 de SEC ID N°: 3).

Esta proteína de fusión es soluble y se une al antígeno con una afinidad similar a la de la inmunoglobulina parental.

El ligador entre los dominios VH y VL en la molécula de la proteína de fusión 19G9scFv consiste en los residuos de aminoácidos 125-144 de SEC ID N°: 1: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID N°: 8).

Esta proteína de fusión particular también comprende una marca de epítipo del extremo C (GAPVPYDPLEPRAA (SEC ID N°: 23)) en los residuos de aminoácidos 391-405 de SEC ID N°: 1. Tales marcas de epítopes se usan frecuentemente para ayudar en la purificación de moléculas expresadas. En otras realizaciones de la invención, los complejos moleculares diméricos de la invención se producen usando proteínas de fusión que no contienen una marca de epítipo o con diferentes marcas de epítopes (por ejemplo, ESSEEGGC (SEC ID N°: 24)).

Los complejos moleculares diméricos de la invención también pueden prepararse usando fragmentos de la cadena pesada de Fab en lugar de anticuerpos monocatenarios como moléculas efectoras biológicas en las proteínas de fusión que constituyen el complejo dimérico (véanse los Ejemplos 5-8). Cuando se forma un complejo molecular dimérico que comprende los fragmentos Fab, el dominio CH1 de la cadena pesada puede estar directamente unido a la región bisagra como en una molécula de inmunoglobulina normal, reduciendo adicionalmente la cantidad de secuencias inmunogénicas no nativas en la molécula. Cuando las cadenas ligeras de Fab se combinan con el complejo molecular dimérico de las cadenas pesadas de Fab, se forma un complejo molecular dimérico de Fab.

Un dímero de Fab que tiene la misma afinidad que una IgG, pero un menor peso molecular, puede construirse eliminando la región Fc. El menor peso molecular de un dímero tal puede producir una elevada penetración tumoral. Además, tales dímeros de Fab no se unirán a receptores de Fc celulares (FcR), reduciéndose así las interacciones relacionadas con FcA no deseadas. Por ejemplo, un complejo molecular dimérico que usa tales dímeros de Fab puede usarse para preparar conjugados de toxina que no se unirán a células con FcγR o el receptor de Fc neonatal (FcRn). La **FIG. 7** muestra un vector usado para generar un complejo molecular dimérico que contiene Fab tal que comprende una cadena ligera (SEC ID N°: 19 y 21, secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos, respectivamente) y una cadena pesada y dominio de IgE (SEC ID N°: 20 y 22, secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos, respectivamente). Un complejo tal tiene un enlace disulfuro interno entre las cadenas ligeras y pesadas del Fab, además de enlaces disulfuro entre las regiones bisagra de las dos proteínas de fusión. Esta molécula no provocará ningún receptor de Fc o actividades mediadas por C1q *in vivo*.

Cuando el dominio de unión de Fc se incluye en una proteína de fusión de Fc, el complejo molecular dimérico generado puede unirse no solo al receptor de Fc, sino también a otras proteínas (por ejemplo, FcγIIIa, FcγIIb, C1q, etc.) y puede desencadenar las funciones efectoras de estas moléculas. La unión a receptores de Fc permite que un conjugado de anticuerpo-toxina se dirija a células que expresan el receptor de Fc. Las propiedades *in vivo* de un anticuerpo que pueden mediar por la interacción de receptores de Fc incluyen citotoxicidad celular dependiente de antígeno (ADCC), fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento, elevada semivida en suero y eliminación disminuida, etc. Los términos 'proteína de fusión de Fc' o 'fusión de Fc' se usan ampliamente para referirse a la práctica de dimerizar proteínas usando la bisagra de IgG y los dominios CH2 y CH3. Tales 'fusiones de Fc' retienen la habilidad de unirse a receptores de Fc.

Realizaciones preferidas de Fab que contienen complejos moleculares diméricos comprenden regiones bisagra en las que el tetrapéptido 'VFLF' "natural" dentro de la región bisagra está sustituido con el tetrapéptido DSEY "mutante" más hidrófilo o con el tetrapéptido 'KSKY', que proporciona lisinas adicionales para la conjugación (véanse SEC ID N°: 5 y 7, respectivamente).

En otras realizaciones de complejos moleculares diméricos que contienen tanto scFv como Fab, secuencias de tetrapéptidos distintas de las dos descritas anteriormente pueden usarse para sustituir el tetrapéptido hidrófobo VFLF, que está presente en el dominio de dimerización "natural" (residuos de aminoácidos 277-280 en SEC ID N°: 3) de la proteína de fusión. La sustitución de este tetrapéptido con diferentes tetrapéptidos en la primera y segunda proteínas de fusión que constituyen la construcción dimérica es de particular utilidad en ayudar a promover la formación de heterodímeros. En realizaciones preferidas, las sustituciones incluyen: SESE o SDSA en una proteína de fusión con SKSK o SRSR en la segunda proteína de fusión. La sustitución de secuencias adicionales para el tetrapéptido hidrófobo que pueden usarse para promover la formación de heterodímeros de este modo incluyen: SESY o SDSY con SKSY o SRSY; o DEEY, DDDY, DDEY, DEDY, EEEY, EDDY, EDEY, o EEDY con RRRY, RKRY, RRKY, RKKY, KKKY, KRRY, KRKY, o KKRY. En la estructura de IgG₁ humana, los dos residuos de Phe en el tetrapéptido hidrófobo empezando en Val₂₄₀ (V₂₄₀FLF) indican hacia adentro, hacia los residuos de Phe correspondientes de la otra cadena pesada en el dímero de IgG₁. Estos residuos de Phe se extienden hacia estructuras de hidrato de carbono unidas a CH2 y localizadas entre los dos dominios CH2 (Saphire (2002) J Mol Biol 319, pág. 9-18). Los residuos de Val y Leu en el tetrapéptido VFLF indican hacia afuera, lejos de los hidratos de carbono y hacia los residuos de aminoácidos en CH2. La sustitución de residuos dentro del tetrapéptido VFLF con residuos menos hidrófobos (Ser, Thr, Asp, Glu, Asn, Gln, Gly, His, Lys, Arg, Cys o Ala) disminuye el número de cadenas laterales hidrófobas expuestas, mejorando así la solubilidad del complejo molecular dimérico. La sustitución con Lys o Cys también proporciona sitios para modificaciones químicas. Para promover la formación de heterodímeros, uno o ambos de los residuos de Phe dentro de una proteína de fusión del complejo molecular dimérico están sustituidos con residuos que poseen una carga opuesta que está presente en la segunda proteína de fusión en el complejo molecular dimérico. La colocación de residuos de carga opuesta dirigidos los unos hacia los otros de cada proteína de fusión que comprende el heterodímero permite la interacción de carga para promover la formación de heterodímeros. En general, si X es cualquier aminoácido que no sea hidrófobo, entonces las siguientes combinaciones de secuencias podrían usarse para preparar heterodímeros por sustitución del tetrapéptido VFLF en las dos moléculas del heterodímero: 1) XEXY o XDXY con XKXY o XRXY; 2) XEXE, XEXD, XDXE o XDXD con XRXR, XRXK, XKXR o XKXK; o 3) XRXE, XRXD, XKXE o XKXD con XEXR, XEXK, XDXK o XDXR.

En otras realizaciones, la secuencia de tetrapéptidos hidrófobos naturales 'VFLF' y el residuo de prolina adyacente

(residuos de aminoácidos 277-281 de SEC ID N°: 3) pueden sustituirse con secuencias de aminoácidos del bucle que conecta CH3 y CH4 en la secuencia de IgE humana (SEC ID N°: 45). Este estiramiento de cinco aminoácidos (VFLFP) puede sustituirse con tanto LysThrSerGly (residuos de aminoácidos 315 a 318 de SEC ID N°: 45) como ThrLysThrSerGly (residuos de aminoácidos 314 a 318 de SEC ID N°: 45). Similarmente, los residuos 277 a 281 en SEC ID N°: 1 (DSEYP) o residuos de aminoácidos 263 a 267 en SEC ID N°: 20 (DSEYP) también pueden sustituirse con estas secuencias derivadas de IgE con el fin de crear complejos moleculares diméricos compuestos enteramente de la secuencia nativa de tanto IgG como IgE humana.

Normalmente, un dominio CH4 de IgE se usa para dimerizar proteínas de fusión de la invención. Sin embargo, con el fin de estabilizar adicionalmente los heterodímeros, variantes de corte y empalme de CH4 de IgE M2" pueden añadirse en los extremos C de las proteínas de fusión que comprenden el complejo molecular dimérico. En una proteína de fusión, una forma ácida de la variante de corte y empalme de CH4 de IgE M2" (ESSEEGGC (SEC ID N°: 26)) se añade al extremo C, mientras que en la segunda proteína de fusión se añade una variante de corte y empalme de CH4 de IgE M2" que contiene aminoácidos básicos (ESSRRGGC (SEC ID N°: 27)). Véase la **FIG. 1C**.

Complejos moleculares diméricos usando otros restos efectores biológicos

Puede usarse una variedad de restos efectores biológicos distintos de moléculas relacionadas con anticuerpos en las proteínas de fusión que comprenden los complejos moleculares diméricos de la invención. En tales proteínas puede o puede no usarse un aminoácido ligador entre el resto efector biológico y la región bisagra. Si se incluye, el aminoácido ligador es preferentemente un ligador de poli Gly de 1 a 10 o más aminoácidos y puede incluir otros aminoácidos, que incluyen Ala, Ser, Thr y Asp. Dependiendo del uso previsto, los complejos moleculares diméricos pueden comprender proteínas de fusión en las que los dos restos efectores biológicos son iguales o diferentes (es decir, homodímeros o heterodímeros, respectivamente). Los heterodímeros se estabilizan de un modo similar al descrito anteriormente.

A. Dominios extracelulares de receptores de membrana de tipo I

Un complejo molecular dimérico que comprende proteínas de fusión en las que el resto efector biológico es un dominio extracelular de un receptor de membrana de tipo I se muestra esquemáticamente en la **FIG. 1D** y tales complejos son útiles como efectores biológicos o para unirse a ligandos. Los receptores de membrana de tipo I útiles en la invención incluyen receptores de TNF, efrinas, Eph, receptores de VEGF, receptores de IGF, trombospondina, trombosmodulina, receptores de PDGF, IL-2R, componentes complejos de TCR, receptores de EGF, receptores de TGF, factor de tejido, receptores de factores de crecimiento, receptor de HGH, receptores de IFN, HER2, receptor de insulina, etc.

B. Citocinas

En algunas realizaciones, el resto efector biológico es una citocina útil para modular respuestas biológicas de células. Citocinas útiles en la invención incluyen linfocinas tales como factor activador de macrófagos (MAF), factor de inhibición de la migración de macrófagos (MMIF), factor de inhibición de la migración de leucocitos (MCF), factor de inhibición de la migración de leucocitos (LMIF), un factor liberador de histamina (HRF), o factor de transferencia (TF). Factores de necrosis tumoral, tales como TNF- α (caquectina) y TNF- β (linfotóxina) pueden ser restos efectores biológicos. Las interleucinas, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, y IL-15, IL-17, pueden ser restos efectores biológicos. Los interferones, tales como IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ω y IF- τ pueden ser restos efectores biológicos.

Otras citocinas útiles incluyen factores estimulantes de colonias, quimiocinas y proteínas de estrés. Ejemplos de factores estimulantes de colonias incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y multi-CSF (IL-3).

Ejemplos de α -quimiocinas incluyen IL-8, NAP-2 (proteína 2 activadora de neutrófilos), PF-4 (factor 4 de plaquetas) y β TG (β -tromboglobulina). Las β -quimiocinas incluyen MCP-1 (proteína 1 quimioatrayente de monocitos), MCP-3, MIP-1 α (proteína 1 α inflamatoria de macrófagos), MIP-1 β y RANTES ("quimiocina expresada y supuestamente secretada regulada tras la activación de T normales"). Otras quimiocinas útiles incluyen, por ejemplo, quimiocinas CCL; quimiocinas CXC (SCYS) o quimiocinas CX3C; quimiocinas XC; y quimiocinas CC, tales como CCL2, CCL7, CCL11, CCL8, CCL13, CCL1, CCL5, CCL16, CCL14, CCL15, CCL23, CCL18, CCL3 y CCL4.

Las proteínas de estrés incluyen proteínas de choque térmico (HSP), proteínas reguladas por glucosa (GRP), ubiquitina y superóxido dismutasa.

C. Enzimas

En otras realizaciones, un resto efector biológico es una enzima, por ejemplo, una enzima proteolítica (una amino peptidasa, una aspartil proteasa, una serina proteasa, una metaloproteasa, una cisteinil proteasa, pepsina, tripsina, trombina, lisozima, factor VII, factor X, factor IX). También pueden usarse otras enzimas, tales como glicosidasas,

esterasas, hidrolasas, nucleasas, sintasas, isomerasas, polimerasas, cinasas, fosfatasas, reductasas, que incluyen oxido-reductasas, transferasas, ligasas, enzimas de restricción, amidasas, ATPasas, carbohidrasas, lipasas, celulasas, deshidrogenasas y oxidasas.

D. Toxinas

- 5 También pueden usarse toxinas terapéuticamente útiles como restos efectores biológicos en las proteínas de fusión que comprenden los complejos moleculares diméricos de la invención. Hay numerosos ejemplos de tales toxinas, muy conocidos para aquellos expertos en la materia, tales como las toxinas bacterianas exotoxina A de *Pseudomonas* y toxina diftérica, y las toxinas de planta ricina, abrina, modicina, saporina y gelonina.

Producción de complejos moleculares diméricos

- 10 Las proteínas de fusión para complejos moleculares diméricos de la invención pueden producirse recombinantemente o sintéticamente, o usando una combinación de los dos enfoques. Para la producción recombinante, la invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión de la invención (véase más adelante).

- Es posible producir una proteína de fusión de la invención usando procedimientos químicos para sintetizar la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión. Los procedimientos incluyen síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154, 1963; Roberge y col., Science 269, 202-204, 1995). La síntesis de proteínas puede realizarse usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431 A (Perkin Elmer). Opcionalmente, los fragmentos de una proteína de fusión pueden sintetizarse por separado y combinarse usando procedimientos químicos para producir una proteína de fusión de longitud completa. Véase el documento WO 01/98340.
- 15
20

Moléculas de ácidos nucleicos

- Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención pueden comprender cualquier secuencia de nucleótidos que codifique la proteína de fusión deseada. Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención incluyen ADN mono y bicatenario (incluyendo ADNc) y ARNm. Muchos kits para construir proteínas de fusión están disponibles de empresas tales como Promega Corporation (Madison, WI), Stratagene (La Jolla, CA), CLONTECH (Mountain View, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA) y Quantum Biotechnologies (Montreal, Canadá; 1-888-DNA-KITS).
- 25

- Procedimientos que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia pueden usarse para construir moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro* y técnicas sintéticas. Tales técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook y col. (1989) y en Ausubel y col., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1989.
- 30

- En algunas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos son construcciones de expresión que contienen los elementos necesarios para la transcripción y traducción de una secuencia codificante insertada que codifica una proteína de fusión. Las construcciones de expresión de dímeros de Fab pueden incluir una secuencia codificante para la cadena ligera con una cisteína del extremo C. Una construcción de expresión puede estar presente en un vector adecuado para introducir proteínas de fusión de la invención en una célula.
- 35

- Las proteínas de fusión de la invención pueden expresarse recombinantemente en una variedad de células huésped. Éstas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN en bacteriófago, plásmido o cósmido recombinantes; levadura transformada con vectores de expresión en levadura, sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión en virus (por ejemplo, baculovirus), sistemas de células de planta transformados con vectores de expresión en virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322), o sistemas de célula animal, particularmente sistemas de mamífero, que incluyen sistemas humanos. Véase el documento WO 01/98340, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. La elección de componentes de vector y células huésped apropiadas está perfectamente dentro de las capacidades de los expertos en la materia.
- 40
45

- En algunas realizaciones de la presente invención, ambas proteínas de fusión de un complejo molecular dimérico se expresan en la misma célula, preferentemente del mismo plásmido, por ejemplo, como un operón dicistrónico (Skerra y col., Protein Eng. 4, 971, 1991). Una secuencia señal puede incluirse para dirigir las proteínas de fusión a la localización celular deseada. La expresión de las dos proteínas de fusión de un complejo molecular dimérico del mismo plásmido conduce a que se forme una elevada cantidad de dímero biespecífico, ya que cantidades equivalentes de cada componente están siendo producidas dentro de la célula.
- 50

Opcionalmente, una proteína de fusión puede comprender un resto que puede usarse como marca de detección o de

purificación, tal como péptidos que comprenden al menos cinco residuos de histidina, o las marcas c-myc y FLAG comúnmente usadas.

Procedimientos de diagnóstico

5 Los complejos moleculares diméricos de la invención también pueden ser útiles para fines de diagnóstico. Por ejemplo, el complejo puede comprender dos proteínas de fusión, una proteína que comprende un resto efector biológico diseñado para unirse a un analito de interés y la otra proteína que comprende una molécula efectora biológica que es, o está unida a, una marca detectable que puede cuantificarse fácilmente, por ejemplo, una enzima, una proteína fluorescente, un radionúclido, etc.

Procedimientos terapéuticos

10 Los complejos moleculares diméricos de la invención pueden proporcionarse en una composición farmacéutica para administración a un mamífero, preferentemente un ser humano. Los complejos compuestos de fragmentos de anticuerpos (tanto mono- como bi-específicos) son particularmente útiles en terapia tumoral. Por ejemplo, una proteína de fusión del complejo puede comprender una molécula que se une a un marcador tumoral y la otra proteína de fusión puede comprender una molécula que se une a un epítipo de linfocitos T, una toxina, o un péptido o proteína que se une a un radionúclido para llevar una función destructora próxima a la célula tumoral.

20 Para preparar composiciones farmacéuticas adecuadas que comprenden complejos moleculares diméricos de la invención, un experto en la materia pueden usar disoluciones estériles fisiológicamente aceptables inyectables conocidas. Para preparar una disolución lista para uso para inyección parenteral o infusión, disoluciones isotónicas acuosas, tales como, por ejemplo, solución salina o disoluciones de proteína plasmática correspondientes, están fácilmente disponibles. Las composiciones farmacéuticas pueden estar presentes como liofilizados o preparaciones secas, que pueden reconstituirse con una disolución inyectable conocida directamente antes de uso bajo condiciones estériles. Una composición farmacéutica puede complementarse con sustancias de vehículo o/y aditivos conocidos (por ejemplo, albúmina de suero, dextrosa, bisulfito de sodio, EDTA, etc.).

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por diferentes vías de administración conocidas para un experto en la materia, particularmente mediante inyección intravenosa o inyección directa a los tejidos diana. Para administración sistémica pueden usarse vías intravenosa, intravascular, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, oral o intratecal. Más administración local puede efectuarse subcutáneamente, intracutáneamente, intracárdicamente, intralobalmente, intramedularmente, intrapulmonarmente o directamente en o cerca del tejido que va a tratarse (tejido conjuntivo, óseo, muscular, nervioso, epitelial). Dependiendo de la duración y eficacia deseada del tratamiento, las composiciones pueden administrarse una vez o varias veces, también intermitentemente, por ejemplo, diariamente durante varios días, semanas o meses y en diferentes dosificaciones.

30 La dosificación dependerá de la edad, condición, sexo y grado de la enfermedad en el paciente y puede variar de 0,1 mg/kg a 200 mg/kg, preferentemente de 0,1 mg/kg o 100 mg/kg/dosis, en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno a varios días.

35 Todas las patentes, solicitudes de patente y referencias citadas en esta divulgación se incorporan expresamente en el presente documento por referencia. La divulgación anterior, en general, describe la presente invención. Puede obtenerse un entendimiento más completo por referencia a los siguientes ejemplos específicos, que se proporcionan solamente a fin de ilustración y no pretenden limitar el ámbito de la invención.

Ejemplo 1

40 *Producción de complejos moleculares diméricos de scFv*

Este ejemplo demuestra la producción de dos complejos moleculares diméricos con la estructura mostrada en la FIG. 1A. Se prepararon dos construcciones. En ambas construcciones se añadió un *ligador* de poli-Gly al extremo N de la región bisagra de IgG₁ natural. En una construcción "natural", éste fue seguido de la secuencia nativa de alguna de la primera cadena beta de CH₂ de IgG₁ humana. En la construcción "mutante", las mutaciones se introdujeron para eliminar residuos hidrófobos presentes en la cadena beta "natural" que de otro modo se expondrían al disolvente y podrían posiblemente impedir la solubilidad. Dos residuos hidrófobos, Val₂₄₀ y Ile₂₄₂ dentro de la región constante pesada de IgG₁ (SEC ID N^o: 25), tienen interacciones hidrófobas con el dominio CH₂ de IgG, y dos fenilalaninas, Phe₂₄₁ y Phe₂₄₃, interaccionan con los grupos hidrato de carbono. Estos aminoácidos hidrófobos Val, Phe, Leu y Phe en las posiciones 240-243 de SEC ID N^o: 25 se sustituyeron con los residuos hidrófilos Asp, Ser, Glu y Tyr, respectivamente.

50 Dos grupos de cisteína en la región bisagra producen enlaces covalentes entre cada proteína de fusión tras la dimerización de las regiones CH₄.

Generación del anticuerpo monocatenario

Se generó un anticuerpo monocatenario llamado 19G9scFv a partir de las cadenas de VH y VL que se amplificaron por PCR usando cebadores que introdujeron sitios de restricción y sitios para solapar la extensión del ligador de 16 aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID N°: 5). Después de 15 ciclos de extensión, scFv se amplificó con los cebadores directos e inversos originales y se clonó por digestión con restricción en el vector de expresión bacteriano pz613. Véase la FIG. 2.

Cebador directo de VH: GCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTTTCAGCTGGTGCAGTC (SEC ID N°: 15);

Cebador inverso de VH:

CCACCGAGCCGCGCCGCCAGAACCACCACCACCAGAACCACCACCACCTGAAGAGAC GGTGACC
(SEC ID N°: 16);

Cebador directo de VL:

GGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGAAATTGTGTTGACGCAGTC (SEC ID N°: 17);

Cebador inverso de VL: GCGGCCGCTTTGATCTCCACCTTGGTCC (SEC ID N°: 18).

Generación del dominio de dimerización CH4

El dominio CH4 de IgE se clonó a partir de ARNm comprado de Invitrogen (clon 2132581) usando cebadores de PCR "ATG001" (IgECH4_bk_a): CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCGCGTGCT GCCCCGGAAG (SEC ID N°: 9) y "ATG003" (IgECH4_for_a): CGGATACGGC ACCGGCGCAC CTTTACCGGG ATTTACAGAC (SEC ID N°: 11). La región bisagra de IgG₁ y la primera cadena beta de CH2 de IgG₁ se introdujo por PCR usando el cebador "ATG002": TTCCTCTTCC CCCGCGTGTC TGCCCCGAA G (SEC ID N°: 10). Se introdujeron sitios *Not*I y *Sgr*A1 por los cebadores ATG001 y ATG003, respectivamente. Estos sitios permitieron la clonación directa por digestión con restricción de la fusión de la región bisagra de IgG₁-CH4 de IgE en el vector monocatenario ("19G9"). Véase la FIG. 3.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión "natural" 19G9scFv, algunas veces denominada 19G9M1 (SEC ID N°: 3) se muestra en la FIG. 5A. La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión "mutada", denominada 19G9M2 (SEC ID N°: 1), que contiene la secuencia DSEY en los residuos de aminoácidos 277-280 en el dominio de dimerización, se muestra en la FIG. 4B.

Ejemplo 2*Expresión, purificación y función de complejos moleculares diméricos de scFv*

La construcción del complejo molecular dimérico 19G9scFv "mutante" (19G9M2; SEC ID N°: 1) descrita en el Ejemplo 1 se clonó en el vector de expresión de mamífero pPEP1 poly y se expresó en células CHO. La purificación se llevó a cabo usando cromatografía de afinidad por marca de epítipo, y el complejo purificado se probó para la unión, especificidad por antígenos y afinidad usando un ELISA. Véase la FIG. 5A. El peso molecular del complejo purificado (reducido y no reducido) se analizó en un sistema de SDS-PAGE. Se usó 4 %-12 % de SDS-PAGE, con un tampón de electroforesis de MES SDS en 40 minutos a 120 mA, 200 V. Véase la FIG. 5B.

La FIG. 6 muestra los resultados de la unión del complejo molecular dimérico 19G9M2 a la proteína BHK-RG-1 en comparación con la unión del diacuerpo correspondiente (el anticuerpo monocatenario dimérico preparado a partir de VH y VL de 19G9 ligadas por un ligador de cinco aminoácidos acortado). El diacuerpo y la IgG de 19G9 tienen actividad equivalente. La CE₅₀ es aproximadamente nanomolar. La concentración de anticuerpo se calculó basándose en pesos moleculares de 80 kD para el complejo molecular dimérico y 50 kD para el diacuerpo. El anticuerpo secundario usado en el ensayo fue HRP-anticuerpo anti-marca E.

Ejemplo 3*Demostración de la formación de enlaces disulfuro en la región bisagra*

La FIG. 5B es un gel de SDS-poliacrilamida teñido con azul de Coomassie que demuestra que la preparación del complejo molecular dimérico descrita en los Ejemplos 1 y 2 comprende predominantemente dímeros de disulfuro (carriles 2 y 3) con solo una pequeña contaminación por monómero. Tras la reducción, todos los dímeros de disulfuro colapsan a monómeros (carriles 5 y 6). Este resultado demuestra que la región bisagra de la IgG₁ funciona apropiadamente y que los enlaces disulfuro se forman en la bisagra después de dimerizarse el dominio CH4 de IgE. Carriles, de izquierda a derecha: **1**, 10 µl de marcador; **2**, 2 µl de 19G9 M2; **3**, 5 µl de 19G9 M2; **4**, blanco; **5**, 2 µl de 19G9 M2 reducido; **6**, 5 µl de 19G9 M2 reducido; **7**, 10 µl de marcador.

Ejemplo 4*Biodistribución in vivo del complejo molecular dimérico 19G9*

5 Procedimientos de radiomarcado y de unión a quelante se adaptaron de Nikula y col. (1995), Nucl. Med. Biol., 22, 387-390. El complejo molecular dimérico 19G9scFv purificado, IgG de 19G9, 19G9scFv y el diacuerpo 19G9 se caracterizaron por SEC y SDS-PAGE antes de uso. El marcado se realizó usando ¹¹¹In, en tampones y equipo que se convirtieron en libres de metal por aclarado repetido con disolución 10 mM de EDTA y tratamiento con Chelex antes de la filtración. El quelante p-SCN-CHX-A"-DPTA se compró de Macrocyclics Inc. El tampón usado para la conjugación contuvo carbonato 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5. El radiomarcado se realizó en un tampón que contenía NaAc 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5.

10 Las disoluciones de anticuerpo radiomarcado con ¹¹¹In (PBS) de los cuatro grupos de anticuerpos descritos anteriormente se inyectaron en 8 ratones portadores de tumor LNCaP por grupo (2 µCi por animal). Dos animales por grupo se pesaron, se sacrificaron y los tejidos se recogieron 15 min, 3 h, 6 h y 48 h tras la inyección de anticuerpo marcado. El tumor, tejido o muestra de sangre se pesó y se determinó la radiactividad total. mCi por gramo de muestra se comparó con mCi total por peso de animal para determinar el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido y el promedio se calculó para cada grupo y momento de tiempo (% medio de DI por gramo). Los resultados se muestran en la **FIG. 8**.

Ejemplo 5*Producción de proteínas de fusión de Fab y expresión de complejos moleculares diméricos de Fab*

20 Este ejemplo demuestra la producción de complejos moleculares diméricos de Fab con la estructura mostrada en la **FIG. 1B** (es decir, un complejo molecular dimérico mono-específico en el que el resto efector biológico es un fragmento Fab). Esta construcción no tiene ninguna secuencia de ligador entre el extremo C del dominio CH1 de Fab y el extremo N de la región bisagra de IgG₁ y la secuencia en esta región es la misma que en una IgG.

25 En la región bisagra de IgG₁, cuatro aminoácidos hidrófobos, Val, Phe, Leu y Phe (residuos de aminoácidos 263-266 de SEC ID N°: 20) localizados en el extremo C de la región bisagra, se sustituyeron con los residuos hidrófilos Asp, Ser, Glu y Tyr respectivamente, para evitar la posible dificultad en la solubilidad. Los dos grupos de cisteína presentes en la región bisagra producen enlaces covalentes entre cada proteína de fusión tras la dimerización de las regiones CH4. Otra cisteína también se localiza en el extremo C de tanto CH1 como CL para permitir que estos dominios se unan por un enlace disulfuro covalente.

(a) Inserción de la región bisagra de IgG1 y dominio CH4 de IgE en el vector de expresión de IgG1

30 El ADN que codifica la región bisagra de IgG1 y el dominio CH4 de IgE se amplificó por PCR usando cebadores que introdujeron sitios de restricción PciI y FseI, y entonces esta región se clonó por digestión con restricción en el vector de clonación pCR2.1_TOPO para producir pCR2.1_bisagra_IgE CH₄ para crear la cadena pesada de la proteína de fusión de Fab del complejo molecular dimérico J_DSEY.

Cebador directo de ATG47: CTCACACATGTCCACCGTGCCAGCACCTGAAC (SEC ID N°: 31);

35 Cebador inverso de ATG46: TGTGGCCGGCCCTATTTACCGGGATTTACAGACACCGCT (SEC ID N°: 32);

Los dominios de VH y CH de un anticuerpo Fab (ABJ) se amplificaron por PCR usando cebadores que introdujeron un sitio de restricción PciI, y se clonaron por digestión con restricción (EcoRV y PciI) en pCR2.1_bisagra_IgE CH₄.

Cebador directo de ATG51: GTTGAATAAACGTACGGTGGCTGC (SEC ID N°: 33);

40 Cebador inverso de ATG56: GACATGTGTGAGTTTTATCGCAGCTTTTCGGTTCCTTTTTATCC (SEC ID N°: 34);

El complejo de la cadena pesada entero se amplificó por PCR usando cebadores que introdujeron un sitio de restricción XmaI, y luego se clonó por digestión con restricción (BlnI y XmaI) en un vector de expresión de IgG₁, pIE_ABJ para producir el vector pIE-J_DSEY. Véase la **FIG. 9**

Cebador directo de ATG75: CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCG (SEC ID N°: 35);

45 Cebador inverso de ATG76: CGACTCCCGGGTTACTATTTACCGGGATTTACAGACAC (SEC ID N°: 36).

(b) Generación de una segunda proteína de fusión de Fab de la cadena pesada

Se generó una segunda construcción molecular dimérica de Fab con un dominio bisagra de IgG₁ diferente (más básico)

a partir de la cadena pesada del dímero J_DSEY y el dominio CH4 de IgE (SEC ID N°: 20) sustituyendo los aminoácidos Asp, Ser, Glu y Tyr en las posiciones 263 a 266 de SEC ID N°: 20 con Lys, Ser, Lys y Tyr (KSKY) usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange II proporcionado por Stratagene y un conjunto apropiado de cebadores.

5 Cebador directo de ATG85: GGGGGACCGTCAAAAAGCAAATACCCGCGCGTGC(SEC ID N°: 37);

Cebador inverso de ATG86: GCACGCGGCGGGTATTTGCTTTTTGACGGTCCCC (SEC ID N°: 38);

produciendo el vector pIE-J_KSKY.

Ejemplo 6

Expresión y purificación de los complejos moleculares diméricos de Fab J_DSEY y J_KSKY

10 Las construcciones de proteínas de fusión de la cadena pesada de Fab J_DSEY y J_KSKY descritas en el Ejemplo 5 se clonaron cada una en el vector de expresión de mamífero pIE-ABK y se expresaron en células CHO-K1. La purificación de cada producto de expresión se llevó a cabo usando cromatografía de afinidad por proteína L, y los complejos purificados se probaron para unión, especificidad por antígenos y afinidad usando un ELISA. El peso molecular de los complejos purificados se analizó en un sistema de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (4 %-12 %
15 de SDS-PAGE, con un tampón de electroforesis de MOPS SDS en 60 minutos a 120 mA, 200 V) y se mostró que poseían el peso molecular predicho.

Ejemplo 7

Producción de otra proteína de fusión Fab de la cadena pesada

Se produjo otro complejo molecular dimérico de Fab usando un anticuerpo para el mismo antígeno (AB25).

20 La región variable de la cadena pesada de AB25 (SEC ID N°: 42) se clonó por PCR usando cebadores que introdujeron un sitio de restricción MfeI, y se insertó por digestión con restricción (NotI y BlnI) en el vector de expresión pIE-J_DSEY.

Cebador directo de ATG 105:

GCGCGGCCGCGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCA
GATGGTCTGTCCCAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCG (SEC ID N°: 39);

25 Cebador inverso de ATG106: CCTTTGGTGCAGCTGAGCT (SEC ID N°: 40);

La región variable de la cadena ligera de AB25 (SEC ID N°: 44) se insertó por digestión con restricción (EcoRI y BsiWI) en el vector de expresión pIE-J_DSEY.

Ejemplo 8

Expresión y purificación del complejo molecular dimérico de Fab 25_DSEY

30 La construcción del complejo molecular dimérico 25_DSEY Fab descrita en el Ejemplo 7 se expresó en células CHO-K1. La purificación se llevó a cabo usando cromatografía de afinidad por proteína L, y el complejo purificado se probó para la unión, especificidad por antígenos y afinidad usando un ELISA. El peso molecular del complejo purificado se analizó en un sistema de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y se mostró que poseía el peso molecular predicho.
35 Como era de esperar, la actividad de unión del complejo molecular dimérico (25_DSEY) mejoró en comparación con la de Fab, y equivalente a la unión encontrada con la forma de IgG. La CE₅₀ para el dímero de Fab 25_DSEY dimérico y la IgG están ambas en el intervalo sub-nanomolar. Estudios previos que compararon las formas de Fab monomérico y de IgG dimérica de AB25 en ensayos similares muestran que la IgG dimérica se unió con mayor afinidad que el Fab monomérico, de acuerdo con estos resultados. Véase la **FIG. 13**.

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Heitner, Tara Light, David McLean, Kirk Parry, Renate Satozawa, Noboru Schneider, Doug

<120> Complejos moleculares diméricos

<130> 53472A

ES 2 469 676 T3

<150> US 60/808.840

<151> 25/05/2006

<160> 45

5

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 405

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> construcción dimérica 19G9scFv, bisagra mutante hidrófila

15

<400> 1

```

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

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

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

Ser Val Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50          55          60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65          70          75          80

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

Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Glu Asn Asp Ala Phe Asp
          100          105          110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
          115          120          125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

```

ES 2 469 676 T3

130	135	140
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 145 150 155 160		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser 165 170 175		
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu 180 185 190		
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser 195 200 205		
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu 210 215 220		
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Leu 225 230 235 240		
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Gly Gly 245 250 255		
Gly Gly Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu 260 265 270		
Gly Gly Pro Ser Asp Ser Glu Tyr Pro Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val 275 280 285		
Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr 290 295 300		
Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln 305 310 315 320		
Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr 325 330 335		
Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu 340 345 350		
Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg 355 360 365		
Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val 370 375 380		
Ser Val Asn Pro Gly Lys Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu 385 390 395 400		
Glu Pro Arg Ala Ala 405		

<210> 2

5 <211> 1224

<212> ADN

<213> artificial

ES 2 469 676 T3

<220>

<223> proteína de fusión 19G9scFv, bisagra mutante hidrófila

<400> 2

5

```

atggcccagg ttcagctggt gcagtctggg ggaggcttgg tacaacctgg ggggtccctg    60
agactctcct gtgcaggctc tggattcacc ttcagtagct atgttatgca ctggcttcgc    120
caggctccag gaaaaggtct ggagtgggta tcagttattg gtactggtgg tgtcacacac    180
tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaatgcca gaactccttg    240
tatcttcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggctg tgtattactg tgcaagatgg    300
ggttactatg gttcggggag ttatgagaat gatgcttttg atatctgggg ccaagggaca    360
atggtcaccg tctcttcagg tggtggtggt tctggtggtg gtggttcttg cggcggcggc    420
tccggtggtg gtggatccga aattgtgttg acgcagtctc caggcacctc gtctttgtct    480
ccaggggaaa gagccacctc ctctgcagg gccagtcaga gtgtagcag cagctactta    540
gcctggtacc agcagaaacc tggccaggct cccaggctcc tcatctatgg tgcattcagc    600
agggccactg gcatcccaga caggttcagt ggcagtgggt ctgggacaga cttcactctc    660
accatcagca gactggagcc tgaagatfff gcagtgtatt actgtcagca gtatagtagc    720
tcgctcactt tcggcggggg gaccaaggtg gagatcaaag cggccgcagg cggcgggtgt    780
tccactcaca catgccacc gtgccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagacagc    840
gagtaccccc cgcgtgctgc cccggaagtc tatgcgtttg cgacgccgga gtggccgggg    900
agtcgggaca agcgcacctc cgctgcctg atccagaact tcatgcctga ggacatctcg    960
gtgcagtggc tacacaacga ggtgcagctc ccggacgccc ggcacagcac gacgcagccc   1020
cgcaagacca agggctccgg cttcttcgtc ttcagccgcc tggaggtgac cagggccgaa   1080
tgggagcaga aagatgagtt catctgccgt gcagtcctat aggcagcgag cccctcacag   1140
accgtccagc gagcgggtgc tgtaaatccc ggtaaagggt cgccgggtgcc gtatccggat   1200
ccgctggaac cgcgtgccgc atag                                     1224

```

<210> 3

<211> 405

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> dominio de dimerización CH4 de IgE, bisagra natural

15

<400> 3

ES 2 469 676 T3

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

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

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

Ser Val Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Glu Asn Asp Ala Phe Asp
 100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 145 150 155 160

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 165 170 175

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 180 185 190

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 195 200 205

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 210 215 220

ES 2 469 676 T3

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Leu
 225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Gly Gly
 245 250 255

Gly Gly Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 260 265 270

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val
 275 280 285

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

Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln
 305 310 315 320

Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr
 325 330 335

Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu
 340 345 350

Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg
 355 360 365

Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val
 370 375 380

Ser Val Asn Pro Gly Lys Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu
 385 390 395 400

Glu Pro Arg Ala Ala
 405

<210> 4

<211> 1224

5

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> construcción dimérica 19G9scFv, bisagra natural

10

<400> 4

atggcccagg ttcagctggt gcagtcctgg ggaggcttgg tacaacctgg ggggtccctg 60
 agactctect gtgcaggcte tggattcacc ttcagtagct atgttatgca ctggcttcgc 120
 caggctccag gaaaaggtct ggagtggtta tcagttattg gtactggtgg tgtcacacac 180

ES 2 469 676 T3

tatgcagact ccggaagg ccgattcacc atctccagag acaatgcaa gaactccttg 240
 tatcttcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggctg tgtattactg tgcaagatgg 300
 ggttactatg gttcggggag ttatgagaat gatgcttttg atatctgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcttcagg tgggtgggtg tctgggtggg gtggttctgg cggcggcggc 420
 tccggtgggtg gtggatccga aattgtgttg acgcagtctc caggcacccct gtctttgtct 480
 ccaggggaaa gagccaccct ctctgcagg gccagtcaga gtgttagcag cagctactta 540
 gcctgggtacc agcagaaacc tggccaggct cccaggctcc tcatctatgg tgcattccagc 600
 agggccactg gcatcccaga cagggtcagt ggcagtgggt ctgggacaga cttcactctc 660
 accatcagca gactggagcc tgaagatfff gcagtgtatt actgtcagca gtatagtagc 720
 tcgctcactt tcggcggggg gaccaagggtg gagatcaaag cggccgcagg cggcgggtgt 780
 tccactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 840
 ctcttcccc cgcgtgctgc cccggaagtc tatgcgtttg cgacgccgga gtggccgggg 900
 agtegggaca agcgcaccct cgctgcctg atccagaact tcatgcctga ggacatctcg 960
 gtgcagtggc tacacaacga ggtgcagctc cgggacgccc ggcacagcac gacgcagccc 1020
 cgcaagacca agggctccgg cttcttcgtc ttcagccgcc tggaggtgac cagggccgaa 1080
 tgggagcaga aagatgagtt catctgccgt gcagtccatg aggcagcgag cccctcacag 1140
 accgtccagc gagcgggtgc tgtaaatccc ggtaaagggtg cgccgggtgcc gtatccggat 1200
 ccgctggaac cgcgtgccgc atag 1224

<210> 5

<211> 21

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> construcción de bisagra mutante hidrófila

10

<400> 5

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5 10 15

Ser Asp Ser Glu Tyr
 20

15 <210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> artificial

ES 2 469 676 T3

<220>

<223> dominio CH4 de IgE de complejo molecular dimérico

<400> 6

5

```

Pro Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp
1          5          10          15
Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe
          20          25          30
Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu
          35          40          45
Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser
          50          55          60
Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu
65          70          75          80
Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro
          85          90          95
Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
          100          105          110
    
```

<210> 7

<211> 21

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> construcción de variante de lisina-región bisagra mutante

15

<400> 7

```

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1          5          10          15
Ser Lys Ser Lys Tyr
          20
    
```

20

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

ES 2 469 676 T3

<220>

<223> ligador

<400> 8

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

5 Gly Gly Gly Ser

20

<210> 9

<211> 40

10 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador de ATG001

15

<400> 9

ccgtcagtct tcctcttccc cccgcgtgct gccccggaag 40

<210> 10

20 <211> 31

<212> ADN

<213> artificial

<220>

25 <223> cebador de ATG002

<400> 10

ttctcttccc cccgcgtgct tgccccggaag g 31

30 <210> 11

<211> 40

<212> ADN

<213> artificial

ES 2 469 676 T3

<220>

<223> cebador de ATG003

<400> 11

5 cggatacggc accggcgcac cttaccggg atttacagac 40

<210> 12

<211> 86

<212> ADN

10 <213> artificial

<220>

<223> cebador de ATG004

15 <400> 12

cggcgggtgt tccaactcaca catgccacc gtgccagca cctgaactcc tggggggacc 60

gtcagtcctc ctcttcccc cgcgtg 86

<210> 13

<211> 36

20 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador de ATG006

25 <400> 13

agatcaaagc ggccgcaggc ggcggtggt ccactc 36

<210> 14

30 <211> 113

<212> ADN

<213> artificial

<220>

ES 2 469 676 T3

<223> cebador de ATG019

<400> 14

caaagcggcc gcaggcggcg gtggttccac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga 60

actcctgggg ggaccgtcag acagcgagta cccccgcgt gctgccccgg aag 113

5

<210> 15

<211> 41

<212> ADN

<213> artificial

10

<220>

<223> cebador directo de VH

<400> 15

15 gcgcccagc cggccatggc ccaggtcag ctggtgcagt c 41

<210> 16

<211> 66

<212> ADN

20

<213> artificial

<220>

<223> cebador inverso de VH

25

<400> 16

ccaccggagc cgccgccgcc agaaccacca ccaccagaac caccaccacc tgaagagacg 60

gtgacc 66

<210> 17

<211> 50

30

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador directo de VL

ES 2 469 676 T3

<400> 17
ggcggcgcg gctccggtgg tgggggatcc gaaattgtgt tgacgcagtc 50

<210> 18
5 <211> 28
<212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> cebador inverso de VL

<400> 18
gcggccgctt tgatctccac cttggtcc 28

15 <210> 19
<211> 234
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> cadena ligera de dímero de Fab

<220>
<221> regiones CDR

25 <222> (1)..(234)
<223> Xaa indica bucles de CDR

<220>
<221> misc_feature

30 <222> (44) . . (54)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

<220>
<221> misc_feature

35 <222> (69) . . (76)

ES 2 469 676 T3

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

<220>

<221> misc_feature

5

<222> (109)..(116)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

<400> 19

```

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
 1           5           10          15

Phe Pro Glu Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
      20           25           30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      35           40           45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50           55           60

Arg Leu Leu Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ala
 65           70           75           80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
      85           90           95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
      100          105          110

Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      115           120           125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130          135          140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145          150          155          160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
      165          170          175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
      180          185          190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
      195          200          205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210          215          220

Gly Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225          230

```

10

ES 2 469 676 T3

<210> 20

<211> 376

<212> PRT

<213> artificial

5

<220>

<223> proteína de fusión de Fab, cadena pesada y dominio CH4 de IgE

<220>

10

<221> regiones CDR

<222> (1) . . (376)

<223> Xaa indica bucles de CDR

<220>

15

<221> misc_feature

<222> (46) . . (54)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

<220>

20

<221> misc_feature

<222> (66) . . (85)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

<220>

25

<221> misc_feature

<222> (118) . . (129)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

<400> 20

30

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

ES 2 469 676 T3

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Asp Ser Glu Tyr Pro Pro Arg Ala Ala Pro
 260 265 270

Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys
 275 280 285

Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser
 290 295 300

Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser
 305 310 315

Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser
 325 330 335

Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile
 340 345 350

Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg
 355 360 365

Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
 370 375

<210> 21

<211> 705

5

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cadena ligera de dímero de Fab

10

<220>

<221> región CDR

<222> (1)..(705)

<223> n es bucles de CDR

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (130)..(162)

<223> n es a, c, g, o t

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (205) .. (228)

ES 2 469 676 T3

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

5

<222> (325) .. (348)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 21

10

```

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggcag gcctggtcct ccccgaggat 60
atcgtgctga cccagagccc ggcgaccctg agcctgtctc cgggcgaacg tgcgaccctg 120
agctgcagan nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nntggtacca gcagaaacca 180
ggtcaagcac cgcgtctatt aattnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngg ggtcccggcg 240
cgttttagcg gctctggatc cggcacggat tttaccctga ccattagcag cctggaacct 300
gaagactttg cgacttatta ttgcnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnac ctttgccag 360
ggtacgaaag ttgaaattaa acgtacggtg gctgctccga gcgtgtttat ttttccgccg 420
agcgatgaac aactgaaaag cggcacggcg agcgtggtgt gcctgctgaa caacttttat 480
ccgcgtgaag cgaagttca gtggaaagta gacaacgcgc tgcaaagcgg caacagccag 540
gaaagcgtga ccgaacagga tagcaaagat agcacctatt ctctgagcag caccctgacc 600
ctgagcaaag cggattatga aaaacataaa gtgtatgcgt gcgaagtgac ccatcaaggt 660
ctgagcagcc cggggactaa atcttttaat cgtggcgagt gctga 705
    
```

<210> 22

<211> 1131

15

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cadena pesada de dímero de Fab y dominio CH4 de IgE

20

<220>

<221> regiones CDR

<222> (1)..(1131)

<223> n representa bucles de CDR

25

<220>

<221> misc_feature

ES 2 469 676 T3

<222> (136) .. (162)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

5

<221> misc_feature

<222> (196)..(255)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

10

<221> misc_feature

<222> (352) .. (387)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 22

15

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag      60
gtgcaattgg ttcagagcgg cgcggaagtg aaaaaaccgg gcgaaagcct gaaaattagc      120
tgcaaagggt ccggannnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nntgggtgcg ccagatgcct      180
gggaagggtc tcgagnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn      240
nnnnnnnnnn nnnnncaggt gaccattagc gcggataaaa gcattagcac cgcgtatctt      300
caatggagca gcctgaaagc gagcgatacg gccatgtatt attgcgcgcy tnnnnnnnnn      360
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnntgg ggccaaggca ccctggtgac ggtagtca      420
gcgtcgacca aaggtccaag cgtgtttccg ctggctccga gcagcaaaag caccagcggc      480
ggcacggctg ccctgggctg cctgggttaa gattatttcc cggaaccagt caccgtgagc      540
tggaacagcg gggcgtgac cagcggcgtg cataccttcc cggcgggtgct gcaaagcagc      600
ggcctgtata gcctgagcag cgttgtgacc gtgccgagca gcagcttagg cactcagacc      660
tatatttgca acgtgaacca taaaccgagc aacaccaaaag tggataaaaa agtggaaaccg      720
aaaagctgcy ataaaactca cacatgtcca ccgtgccccag cacctgaact cctggggggga      780
ccgtcagaca gcgagtacct cccgcgtgct gccccggaag tctatgcytt tgcgacgccc      840
gagtggccgg ggagtcggga caagcgcacc ctcgcctgcc tgatccagaa cttcatgcct      900
gaggacatct cgggtgcagt gctacacaac gaggtgcagc tcccggacgc ccggcacagc      960
acgacgcagc cccgcaagac caagggctcc ggcttcttcg tcttcagccg cctggagggtg     1020
accagggccc aatgggagca gaaagatgag ttcactctgc gtgcagtcca tgaggcagcy     1080
agcccctcac agaccgtcca gcgagcggty tctgtaaata ccgtaataa g                1131

```

<210> 23

20

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> marca de epítotope 1

5

<400> 23

Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Ala Ala
1 5 10 15

10

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

15

<220>

<223> marca de epítotope 2

<400> 24

20

Glu Ser Ser Glu Glu Gly Gly Cys
1 5

<210> 25

<211> 446

<212> PRT

25

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) . . (118)

30

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

<220>

<221> región constante pesada de IgG1 de EU

<222> (119)..(446)

35

<223> Xaa representa la región variable ligera

ES 2 469 676 T3

<400> 25

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

ES 2 469 676 T3

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Gln
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Gln Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Gln Gln Tyr Asp Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asn Trp Leu Asp Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Asp Gly Glu Pro Glu Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 26

<211> 8

5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> variante de corte y empalme 1 de IgE de M2"

10

<400> 26

ES 2 469 676 T3

Glu Ser Ser Glu Glu Gly Gly Cys
1 5

5 <210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> variante de corte y empalme 2 de CH4 de IgE M2"

10

<400> 27

Glu Ser Ser Arg Arg Gly Gly Cys
1 5

15 <210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

20 <220>

<223> variante de corte y empalme 3 de CH4 de IgE M2"

<400> 28

Glu Ser Ser Lys Lys Gly Gly Cys
1 5

25 <210> 29

<211> 8

<212> PRT

30 <213> artificial

<220>

<223> variante de corte y empalme 4 de CH4 de IgE M2"

ES 2 469 676 T3

<400> 29

Glu Ser Ser Cys Arg Gly Gly Cys
1 5

5 <210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

10 <220>

<223> variante de corte y empalme 5 de CH4 de IgE M2"

<400> 30

Glu Ser Ser Arg Cys Gly Gly Cys
1 5

15

<210> 31

<211> 33

<212> ADN

20 <213> artificial

<220>

<223> cebador directo de ATG47

25 <400> 31

ctcacacatg tccaccgtgc ccagcacctg aac 33

<210> 32

<211> 39

30 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador inverso de ATG46

35

ES 2 469 676 T3

<400> 32
tgtggccggc cctatttacc gggattaca gacaccgct 39

<210> 33
5 <211> 26
<212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> cebador directo de ATG51

<400> 33
gttgaaatta aacgtacggg ggctgc 26

15 <210> 34
<211> 48
<212> ADN
<213> artificial

20 <220>
<223> cebador inverso de ATG56

<400> 34
ggacatgtgt gagttttatc gcagcttttc ggtccactt tttatcc 48

25 <210> 35
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

30 <220>
<223> cebador directo de ATG75

<400> 35
35 caggtgcaat tggttcagag cg 22

ES 2 469 676 T3

<210> 36

<211> 38

<212> ADN

<213> artificial

5

<220>

<223> cebador inverso de ATG76

<400> 36

10 cgactcccgg gttactattt accgggattt acagacac 38

<210> 37

<211> 35

<212> ADN

15

<213> artificial

<220>

<223> cebador directo de ATG85

20

<400> 37

gggggaccgt caaaaagcaa ataccgccc cgtagc 35

<210> 38

<211> 35

25

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador inverso de ATG86

30

<400> 38

gcacgcggcg ggtattgct tttgacggt ccccc 35

<210> 39

35

<211> 100

ES 2 469 676 T3

<212> ADN

<213> artificial

<220>

5 <223> cebador directo de ATG105

<400> 39

```
gcgcggccgc gccaccatga aacacctgtg gttcttcttc ctgctggtgg cagctcccag 60
atgggtcctg tcccaggtgc aattggttca gagcggcgcg 100
```

10

<210> 40

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

15

<220>

<223> cebador inverso de ATG106

<400> 40

20 ccttggtcg acgctgagct 20

<210> 41

<211> 417

<212> ADN

25 <213> artificial

<220>

<223> región variable de la cadena pesada de AB25

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (133)..(162)

<223> n es a, c, g, o t

ES 2 469 676 T3

<220>

<221> misc_feature

<222> (196)..(255)

<223> n es a, c, g, o t

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (352)..(384)

<223> n es a, c, g, o t

10

<400> 41

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag    60
gtgcaattgg ttcagagcgg cgcggaagtg aaaaaaccgg gcgcgagcgt gaaagtgagc    120
tgcaaagcct ccnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nntgggtccg ccaagcccct    180
gggcagggtc tcgagnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn    240
nnnnnnnnnn nnnnncgggt gaccatgacc cgtgatacca gcattagcac cgcgtatatg    300
gaactgagca gcctgcgtag cgaagatagc gccgtgtatt attgcgcgcg tnnnnnnnnn    360
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnntggggc caaggcacc tggtgacggt tagctca      417

```

15

<210> 42

<211> 139

<212> PRT

<213> artificial

20

<220>

<223> región variable de la cadena pesada de AB25, secuencia de aminoácidos

<220>

<221> misc_feature

25

<222> (45) . . (54)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

<220>

<221> misc_feature

30

<222> (66) . . (85)

ES 2 469 676 T3

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

<220>

<221> misc_feature

5

<222> (118) .. (128)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

<400> 42

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1           5           10           15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20           25           30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
 35           40           45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50           55           60

Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65           70           75           80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 85           90           95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100          105          110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115          120          125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130          135
    
```

10

<210> 43

<211> 390

<212> ADN

15

<213> artificial

<220>

<223> región variable de la cadena ligera de AB25

20

<220>

<221> misc_feature

ES 2 469 676 T3

<222> (130) . . (165)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

5

<221> misc_feature

<222> (208) . . (231)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

10

<221> misc_feature

<222> (328) . . (351)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 43

15

```

atggtgttgc agaccaggt cttcatttct ctggttctct ggatctctgg tgcctacggg      60
gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc      120
ctgagctgcn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnntggta ccagcagaaa      180
ccaggteaag caccgctctc attaatnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nggggtcccg      240
gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa      300
cctgaagact ttgcggttta ttattgcnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nacctttggc      360
cagggta cga aagttgaaat taaacgtacg                                     390

```

<210> 44

<211> 130

20

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> región variable de la cadena ligera de AB25, secuencia de aminoácidos

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (44) . . (55)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (70) .. (77)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (110)..(117)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente

10

<400> 44

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1           5           10           15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20           25           30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35           40           45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50           55           60

Pro Arg Leu Leu Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro
 65           70           75           80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85           90           95

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
 100          105          110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115          120          125

Arg Thr
 130
    
```

15

<210> 45

<211> 427

<212> PRT

<213> homo sapiens

20

<400> 45

ES 2 469 676 T3

Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg Cys Cys Lys Asn
 1 5 10 15

Ile Pro Ser Asn Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Ala Thr Gly
 20 25 30

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Trp Asp Thr Gly Ser Leu Asn
 35 40 45

Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr Leu Ser Gly His
 50 55 60

Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala Trp Ala Lys Gln
 65 70 75 80

Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser Thr Asp Trp Val
 85 90 95

Asp Asn Lys Thr Phe Ser Val Cys Ser Arg Asp Phe Thr Pro Pro Thr
 100 105 110

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

Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile
 130 135 140

Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser
 145 150 155 160

ES 2 469 676 T3

Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu
 165 170 175

Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys
 180 185 190

Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys
 195 200 205

Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro Ser
 210 215 220

Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu Val
 225 230 235 240

Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg
 245 250 255

Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys Gln
 260 265 270

Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr Arg
 275 280 285

Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro His
 290 295 300

Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro Arg
 305 310 315 320

Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly Ser
 325 330 335

Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro Glu
 340 345 350

Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp Ala
 355 360 365

Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe
 370 375 380

Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys Asp
 385 390 395 400

Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr
 405 410 415

Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
 420 425

REIVINDICACIONES

1. Un complejo molecular dimérico que comprende una primera y una segunda proteína de fusión, en el que cada proteína de fusión comprende de su extremo N a C:

(A) un resto efector biológico seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 (1) un anticuerpo monocatenario;
- (2) un fragmento Fab;
- (3) un dominio extracelular de un receptor de membrana de tipo I;
- (4) una citocina;
- (5) una quimiocina;
- 10 (6) una enzima;
- (7) una toxina; y
- (8) un marcador detectable;

(B) una región bisagra de una molécula de IgG unida al resto efector biológico; y

- 15 (C) un dominio de dimerización CH4 de una molécula de IgE covalentemente unido a la región bisagra, en el que el complejo molecular comprende un enlace disulfuro entre un residuo de cisteína en la región bisagra de la primera proteína de fusión y un residuo de cisteína en la región bisagra de la segunda proteína de fusión.

2. El complejo molecular de la reivindicación 1, en el que los restos efectores biológicos de la primera y segunda proteínas de fusión son idénticos.

- 20 3. El complejo molecular de la reivindicación 1, en el que los restos efectores biológicos de la primera y segunda proteínas de fusión son diferentes.

4. El complejo molecular de la reivindicación 1, en el que los restos efectores biológicos de la primera y segunda proteínas de fusión comprenden cada uno un sitio de unión al antígeno.

5. El complejo molecular de la reivindicación 4, en el que los dos sitios de unión al antígeno tienen la misma especificidad.

- 25 6. El complejo molecular de la reivindicación 1, en el que la región bisagra de tanto la primera como la segunda proteínas de fusión es de una molécula de IgG1.

7. El complejo molecular de la reivindicación 6, en el que la región bisagra comprende los residuos de aminoácidos 223 a 243 de SEC ID N°: 25.

- 30 8. El complejo molecular de la reivindicación 6, en el que dentro de la región bisagra de al menos una de las dos proteínas de fusión, el tetrapéptido VFLF, que ocupa las posiciones 240-243 en la IgG, la región bisagra (SEC ID N°: 25), se sustituye con un tetrapéptido seleccionado del grupo que consiste en DSEY, KSKY 1CSEY, DSCY, DEEY, KRKY, SESE, SDSD, SKSK, SRSR, SESY, SDSY, SKSY, SRSY, DDDY, DDEY, DEDY, EEEY, EDDY, EDEY, EEDY, RRRY, RKRY, RRKY, RKKY, KKKY, KRRY, KRKY y KKRY.

9. El complejo molecular de la reivindicación 8, en el que el tetrapéptido es KSKY.

- 35 10. El complejo molecular de la reivindicación 8, en el que el tetrapéptido VFLF dentro de la región bisagra de tanto la primera como la segunda proteínas de fusión se sustituye con el mismo tetrapéptido.

11. El complejo molecular de la reivindicación 10, en el que el tetrapéptido de sustitución está seleccionado del grupo que consiste en DSEY, KSKY, DEEY y KRKY.

- 40 12. El complejo molecular de la reivindicación 8, en el que el tetrapéptido VFLF dentro de la región bisagra de cada una de la primera y segunda proteínas de fusión se sustituye con un tetrapéptido diferente.

13. El complejo molecular de la reivindicación 12, en el que el tetrapéptido VFLF dentro de la región bisagra de la primera proteína de fusión se sustituye con el tetrapéptido DSEY y dentro de la región bisagra de la segunda proteína de fusión se sustituye con el tetrapéptido KSKY.

14. El complejo molecular de la reivindicación 9, que comprende además un resto covalentemente unido a una lisina en la región bisagra, en el que el resto es una toxina o un poliglícol.
15. El complejo molecular de la reivindicación 1, que comprende además una marca de epítotope en su extremo C.
- 5 16. El complejo molecular de la reivindicación 15, en el que la marca de epítotope comprende GAPVPYDPLEPRAA (SEC ID N°: 23).
17. El complejo molecular de la reivindicación 1, que comprende además una variante de corte y empalme de IgE M2" que tiene la secuencia de SEC ID N°: 26 en el extremo C de la primera proteína de fusión y una variante de corte y empalme de IgE M2" diferente que tiene la secuencia de SEC ID N°: 27 en el extremo C de la segunda proteína de fusión.
- 10 18. El complejo molecular de la reivindicación 1, que comprende además un ligador de aminoácidos entre el resto efector biológico y la región bisagra, en el que el ligador está covalentemente unido al extremo C del resto efector y el extremo N de la región bisagra.
19. El complejo molecular de la reivindicación 5, en el que tanto la primera como la segunda proteínas de fusión comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1.
- 15 20. El complejo molecular de la reivindicación 5, en el que tanto la primera como la segunda proteínas de fusión están codificadas por la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 2.
21. El complejo molecular de la reivindicación 19, en el que los residuos de aminoácidos en las posiciones 277-281 de SEC ID N°: 1 (DSEYP) se sustituyen con residuos de aminoácidos KTSG (residuos 315-318 de SEC ID N°: 45) o con residuos de aminoácidos TKTSG (residuos 314-318 de SEC ID N°: 45).
- 20 22. El complejo molecular de la reivindicación 5, en el que tanto la primera como la segunda proteínas de fusión están codificadas por la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 22.
23. El complejo molecular de la reivindicación 22, en el que los residuos de aminoácidos en las posiciones 263 a 267 de SEC ID N°: 20 se sustituyen con residuos de aminoácidos KTSG (residuos 315-318 de SEC ID N°: 45) o con residuos de aminoácidos TKTSG (residuos 314-318 de SEC ID N°: 45).
- 25 24. Una composición farmacéutica que comprende: el complejo molecular dimérico de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30

35

40

FIG. 1A

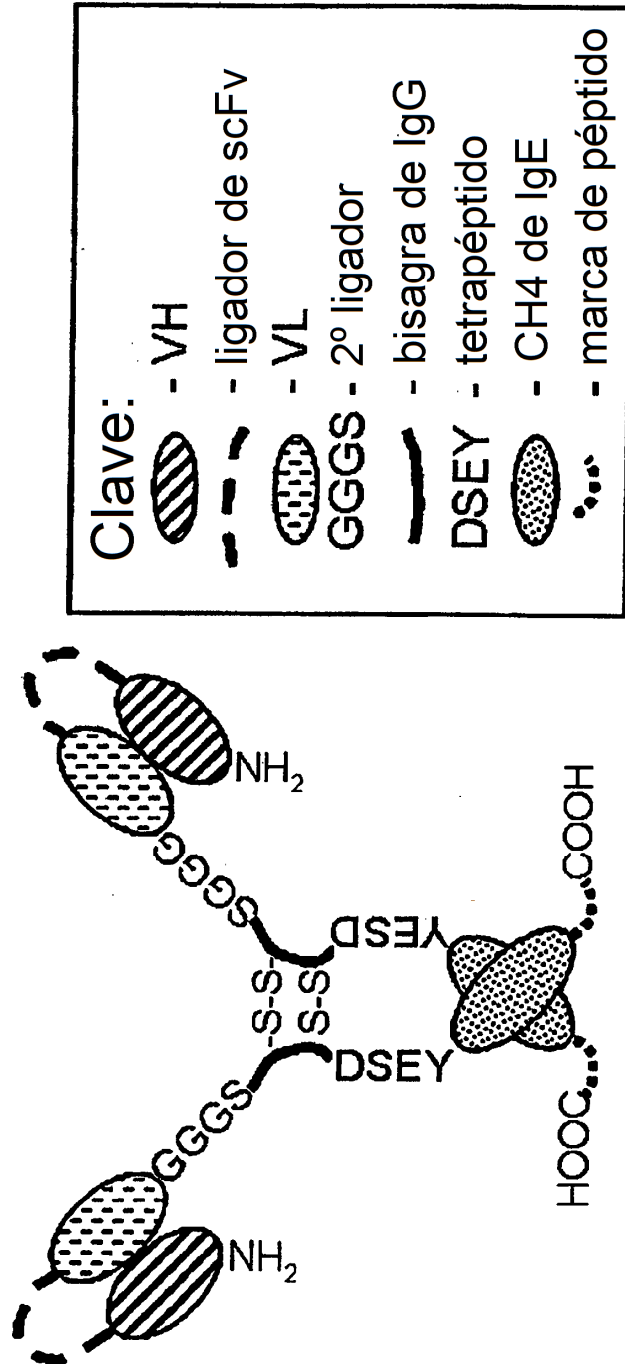
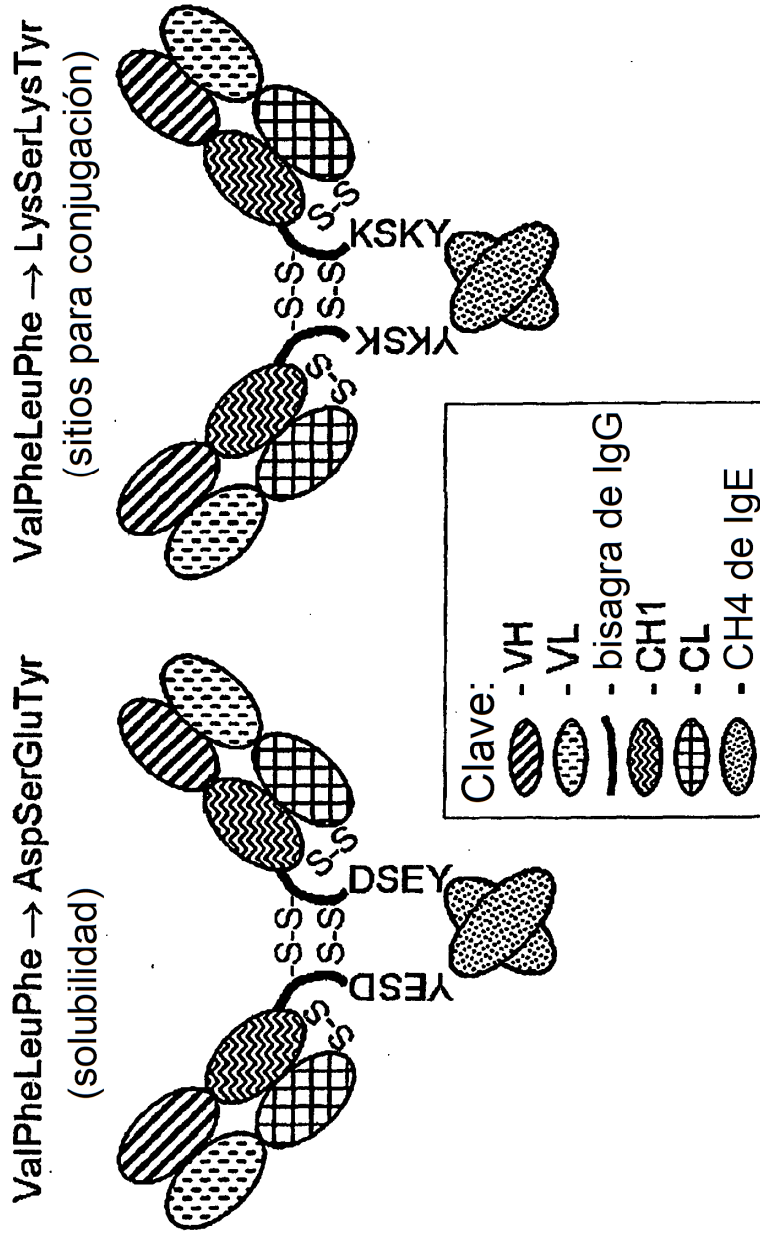


FIG. 1B

Moléculas de dímeros de Fab:



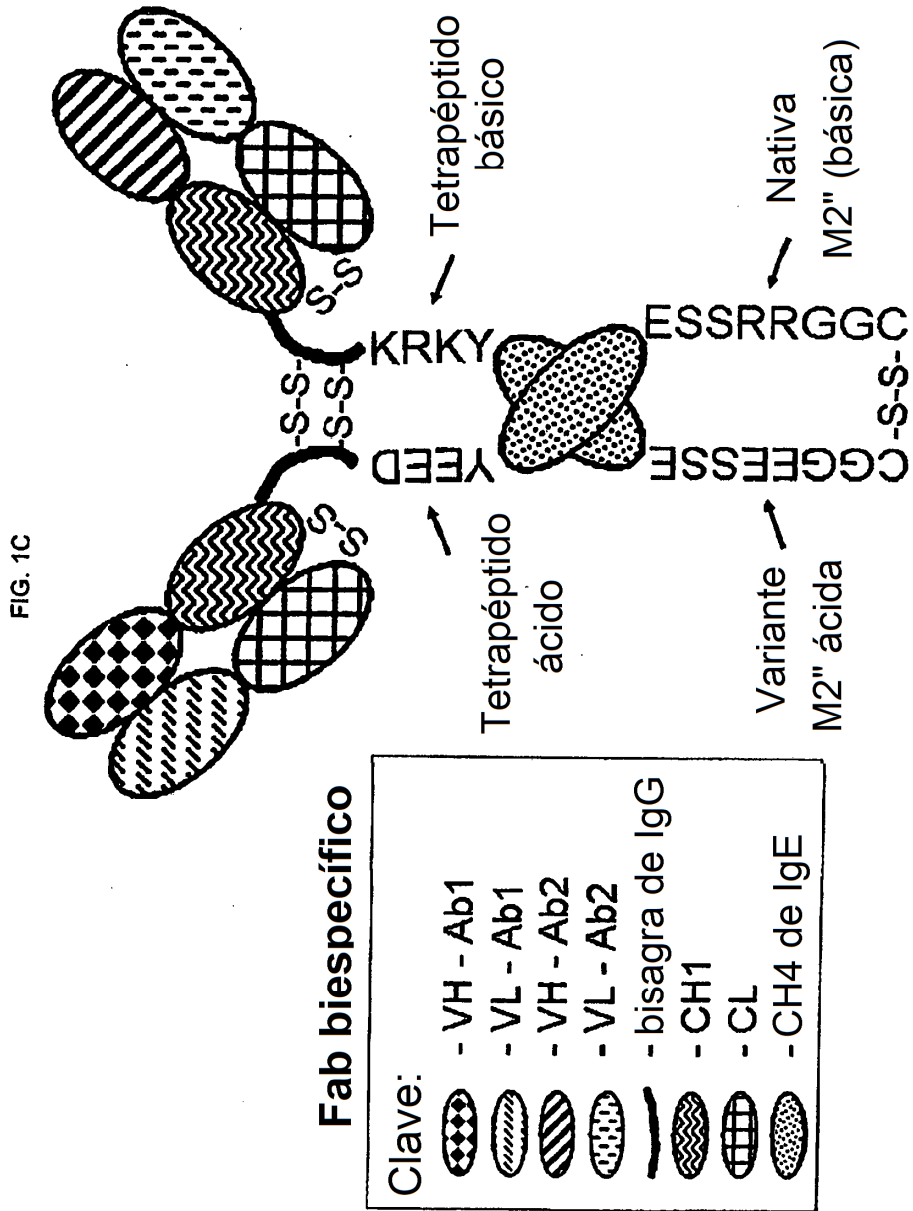


FIG. 1D

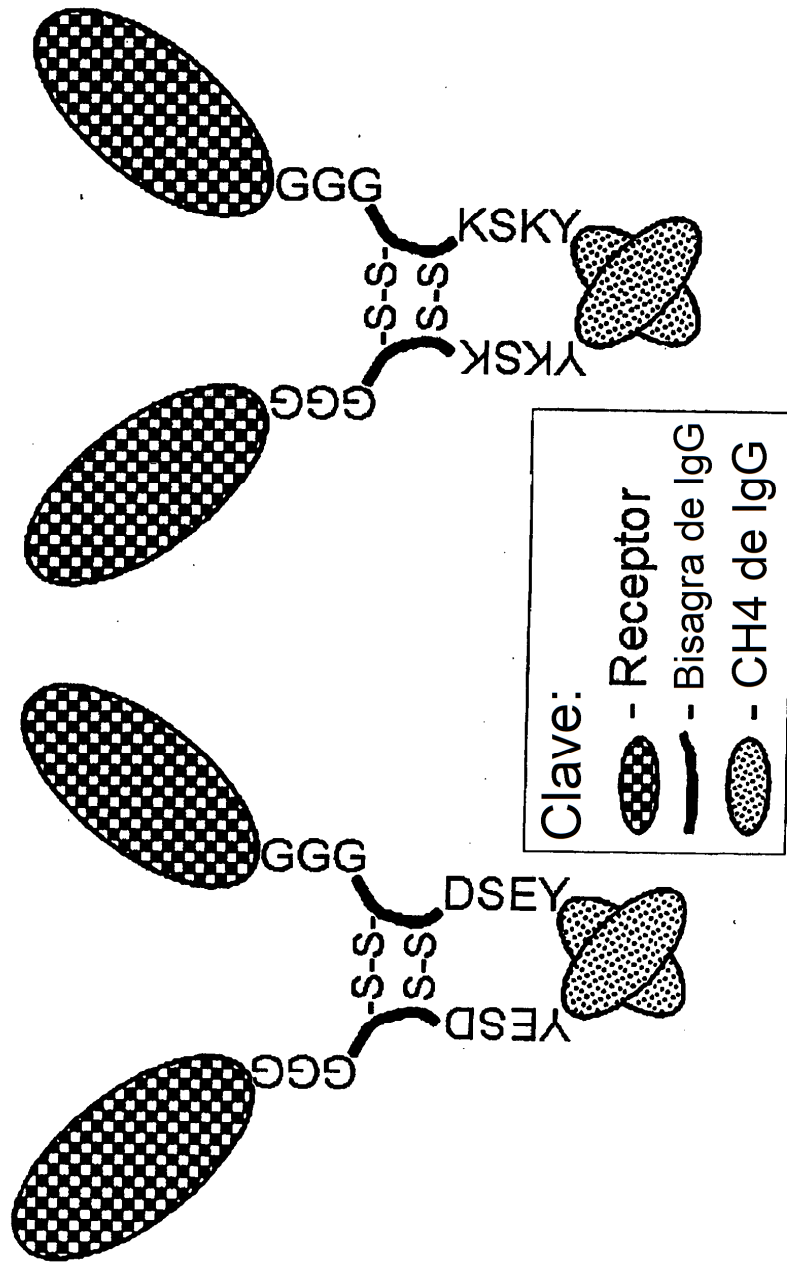
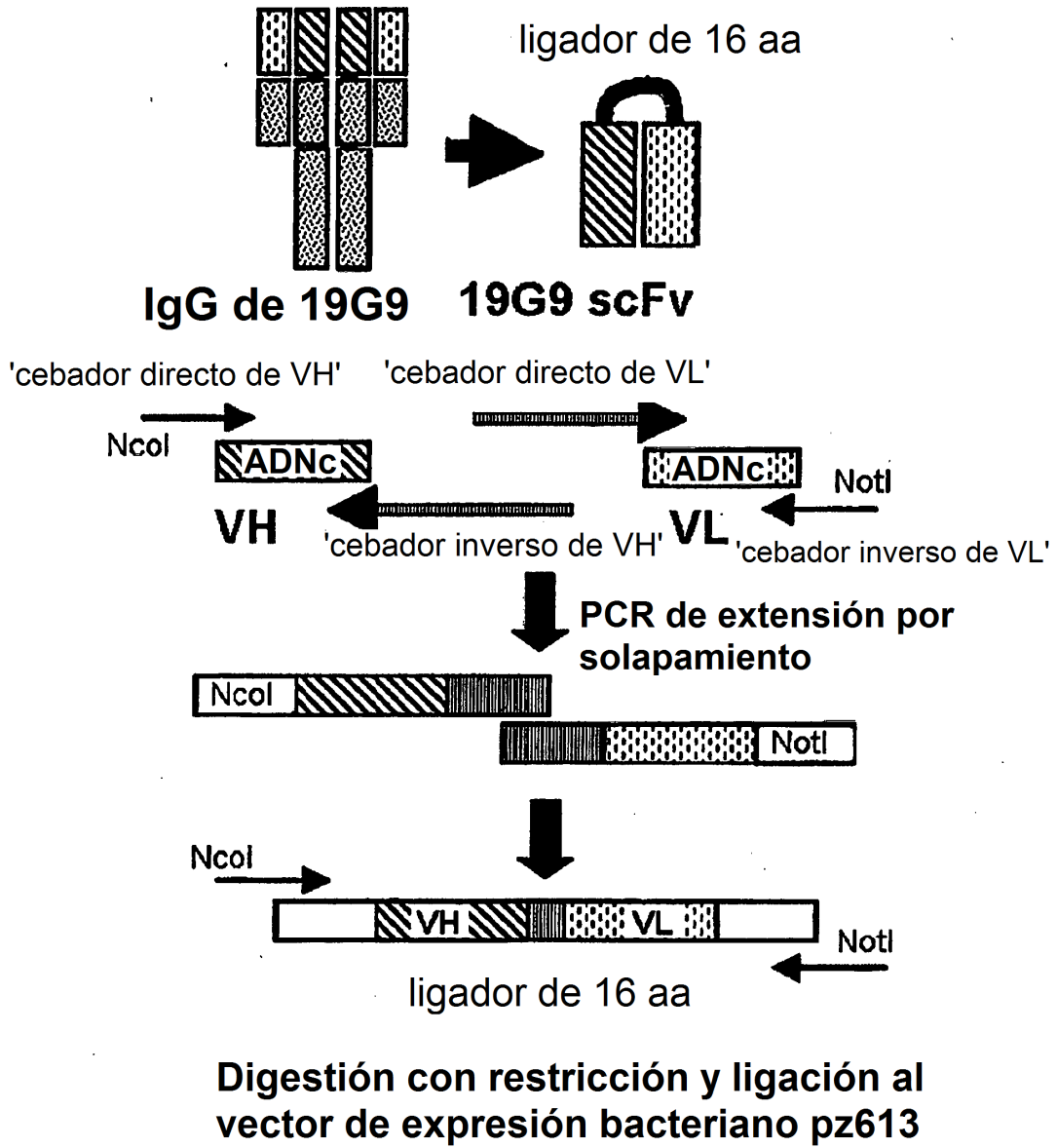


FIG. 2



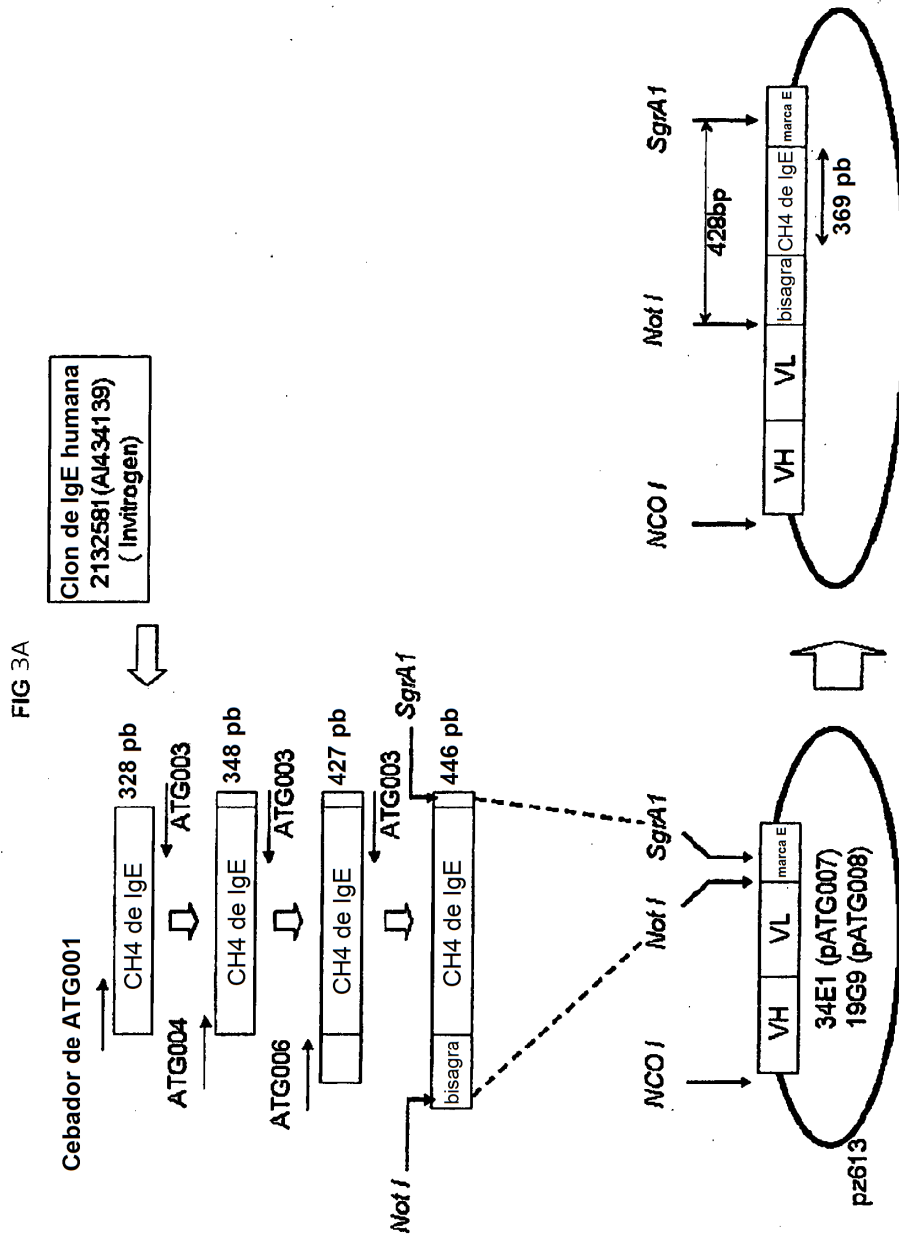


FIG. 4B

Secuencias del complejo molecular dimérico 19G9 mutante
ADN (SEC ID N°: 2) y proteína

```

      HcFI      PvuII
      -----
1  CTTTCTATCC GACCCAGGCG GCGRTGCGTC AGGTTCACTT GGTCCAGTCT GCGGAGGCT TCGTACAACC TCGGGGCTCC CTGAGACTCT CCGTCCAGG
101 CTTGCGATCC AGCTTCAGTA GCTAGGTTAT GCGCTGGCTT CCGCAGCTCC CAGGAAAGG TCTGGAGTGG GTATTCAGTTA TTGGTACTGG TCGTCTACA
      NYADDSVK GEF TIEK DHA EDS LYL DMS LBA S D T A
201 CAGTATGCAG ATCCCTGAAA GCGCGATTO ACCATCTCCA CAGACKATGC CAGGAATCTC TTGTATCTTC AAATGAKCAS CCGAGAGCC GAGGACAGG
      V Y Y P C A R W G Y Y G S G S Y E H D A F D I W G G G T H V T V S S
301 CCGTGTATTA CTGTGCAACA TGGGGTACTT ATCGTTCCGG CAGTTATGAG AATGATCCTT TTGATATCTG GGGCCAAGG ACAATGCTCA CCGTCTCTTC
      BamHI
      -----
401 AAGTCCCTGT GGTTCCTGCTC CTGCTGCTCC TCGCCGCGCC GACTCCGCTO CTGCTGATC CGMAATTGTS TTGACCGGT GTGAGGCAG CCGTCTCTTC
      TctII
      -----
501 SPGERRT LSCRAASQSVSSSTLAHTOQY?GDA PRL
TCTCCAGGG AAGAGCCAC CCTCTCTCC AGGCGCATC AGACTTTAG CAGCAGCTAC TTAGCTGCT ACCAGCAGAA ACCTGGCCAG CCTCCAGGC
      LIYQASCAATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
601 TCGTCTATCA TCGTGCATCC AGCAGGCCA CTGGCATCC AGACAGCTTC AGTGGCAGTG CCGTCTGGAC AGACTTCACT CTACATCA GCAGATGGA
Igf1_hinge_splice_bk
      -----
      IgG1hng_IgBCH4_Bk_a
      -----
      NotI
701 PEDFRAVYVYQOYSSSLTEGGGETNVEIKAAAEGG
CGCTCAGAT TTTGCACTG ATTACTGTCA GCAATATAT AGCTCCCTCA CTTTCCGCG GCGGACDCA GTCAGATCA AACCTGGCC AGCTCCGCT
      IgG1_hinge_splice_bk
      -----
Igf1hng_IgBCH4_bk_a
      -----
801 QSTHTCFPCPAPELLEGCPSPDSEYPPRAAPEVYAF
GTTCCACTC ACAGATGCT ACCGTGCGCA GCGCTGAGT TCGTGGGGG ACCCTCAGC ACCGATATC CCGCGCTCC TCGCCGAAA GTCZAGGCT
      ATPEHFGSEKFKRTLACLTQHFKPZDITSVQNLHN
901 TCGAGACCC GAGTCCGCG GAGACCGCG ACAGCCGAC CCGCCCTCC CTGATCCACA ACTTCATCC TTAGCAGTC TCGCTGACT CCGTCCAGAA
      EVQLFDDA R H S T T Q P R R T N E S G F E V F S R L E V T R A
1001 CAGATGTCG CTCCCGGAC CCGCCACAG CAGCAGCAG CCGCCGAGA CCAAGGCTC CCGCTCTTC CTCTCCAGC CCGTGGAGT GACCAGGCC
      IgECH4_Frc_a
      -----
1101 EWEQKDEPFICRAVHFAASPSQTVQRAVSVNPEGK
GATAGGACG AAGAGATCA GTTATATGCG CCGTCACTCC ATGAGGACG CAGCCDCTCA CAGACCTCTC AACAGCTCC CCGTCAACT CCGCTGAAA
      IgECH4_Frc_a
      -----
      SgrAI      BamHI
      -----
1201 AFVPPYPDPLEPRAA*
GTCCCCCGT GCGGTATCC GATCCCTCC AACCCCTGC CCGATAAAT
    
```

Secuencia de aminoácidos del complejo molecular dimérico 19G9 scFv
hidrófilo mutante - SEC ID N°: 1

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYVMHNLRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTHY
ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGYGSGSYENDAFDIWQGTMVT
VSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSY
LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSS
LTFGGGTKEIKAAAGGGGSTHTCPPPAPELLGGPSDSEYPPRAAPEVYAFATPEWPGRD
KRTLACLIQNFMPEDISVQWLHNEVQLPDRHSTTQPRKTKGSGFFVFSRLEVTRAWEQKD
EFICRAVHEAASPSQTVQRAVSVNPGKAPVPPYDPLEPRAA

FIG. 5A

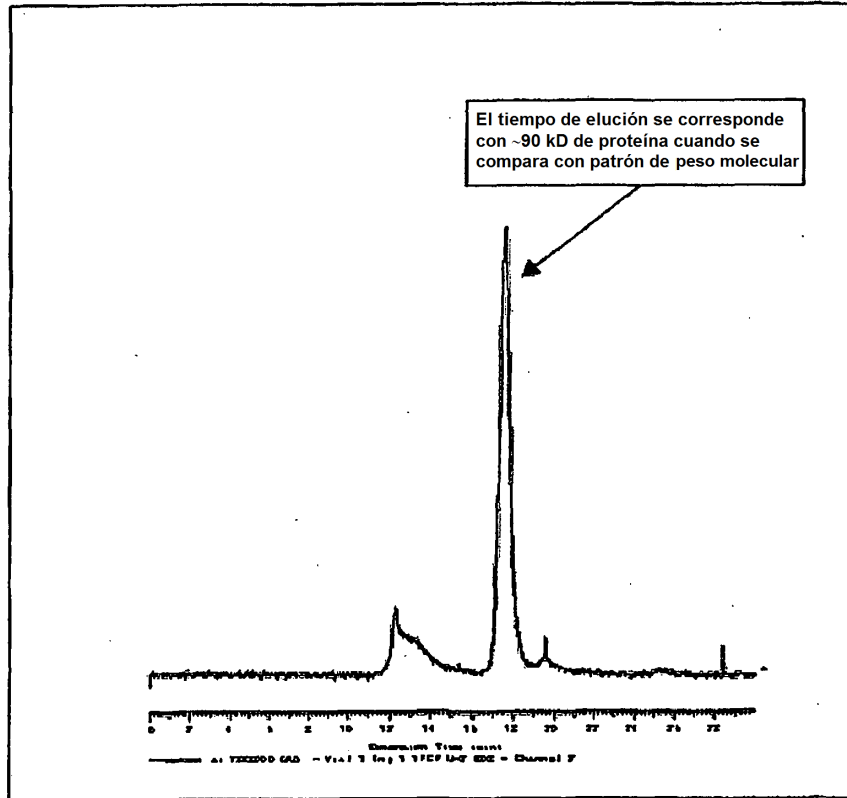


FIG. 5B

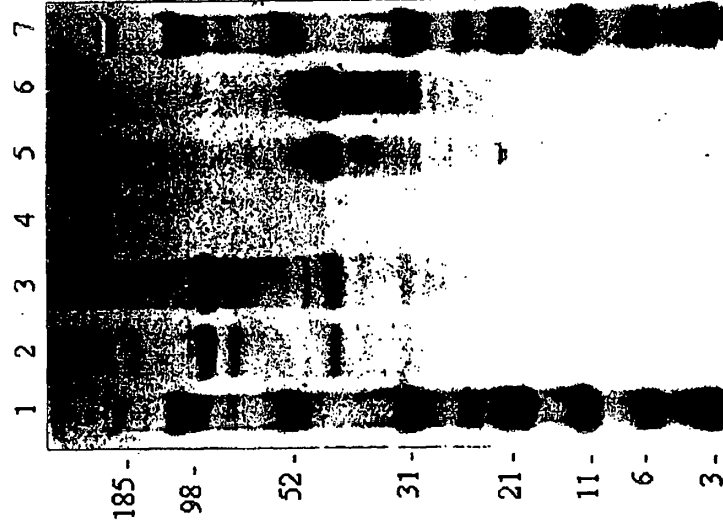
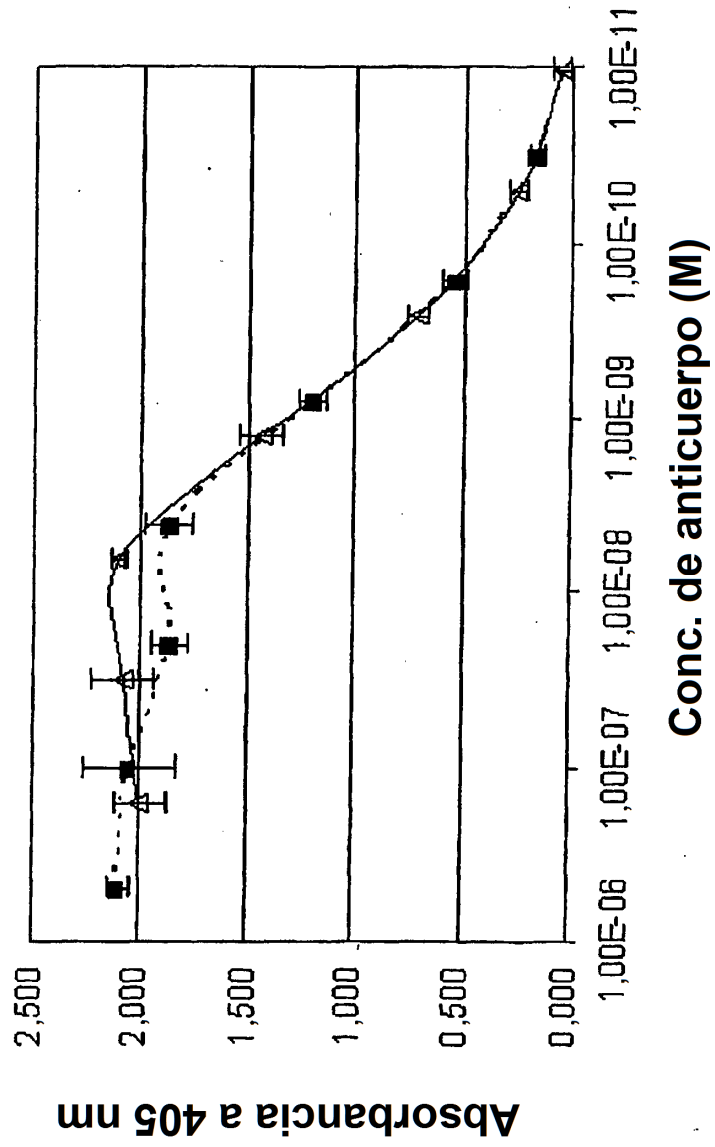


FIG. 6



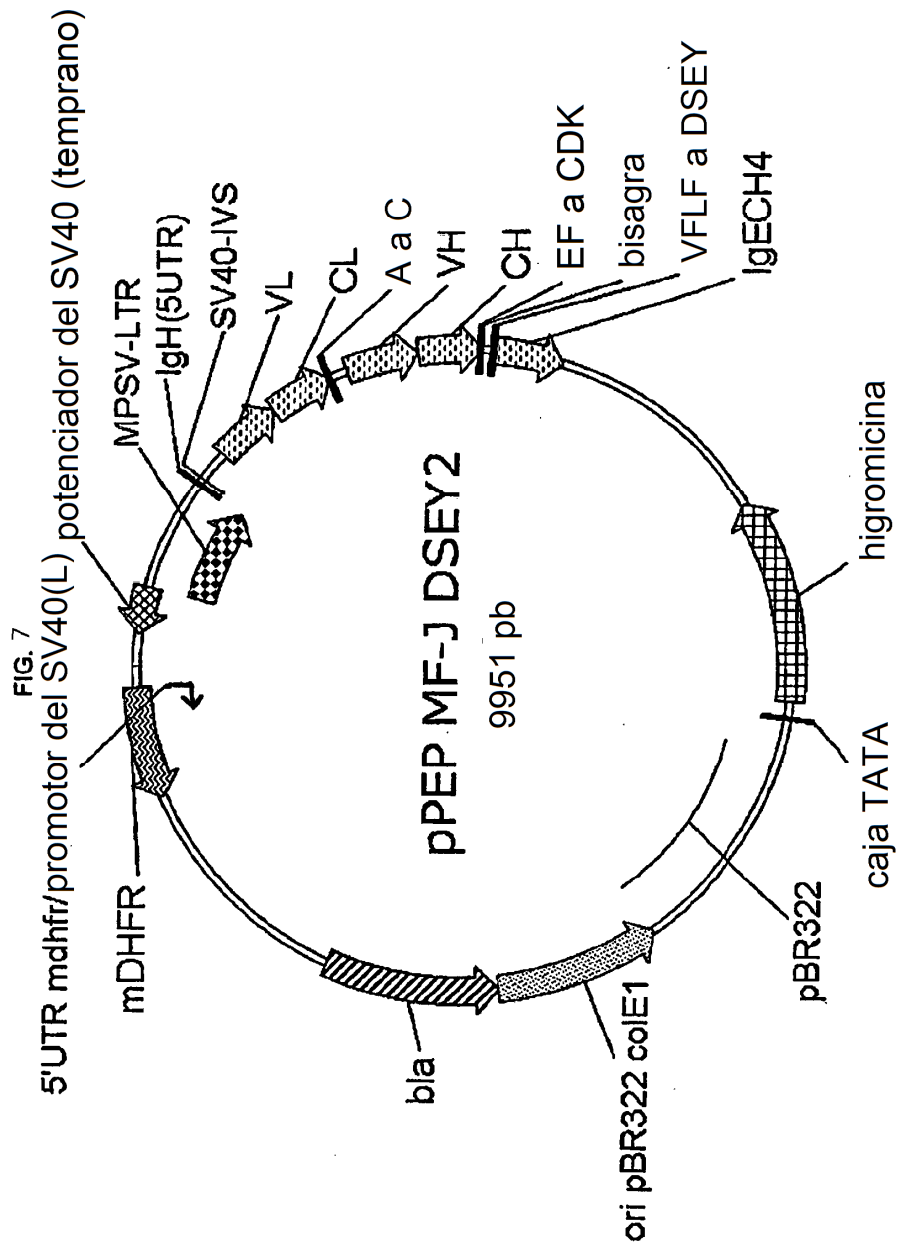


FIG. 8

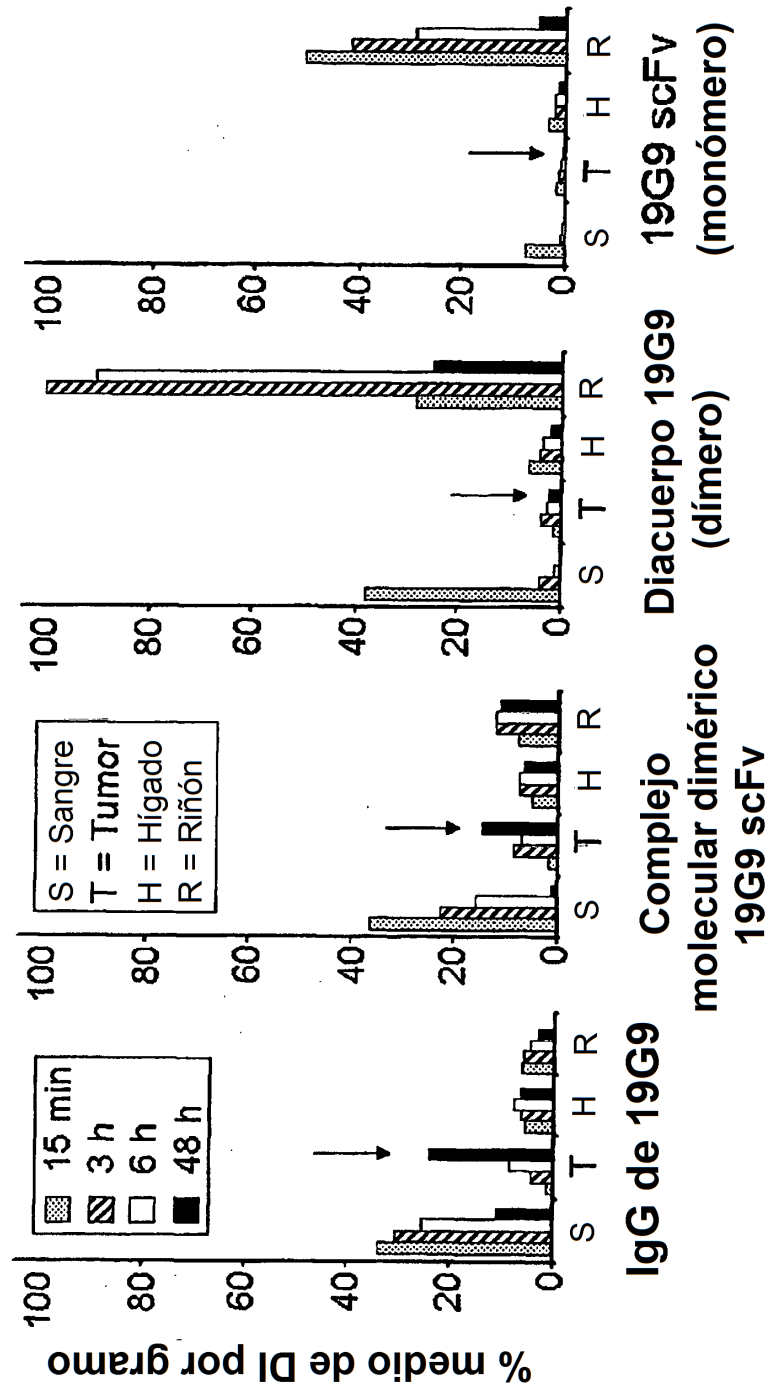


FIG. 9

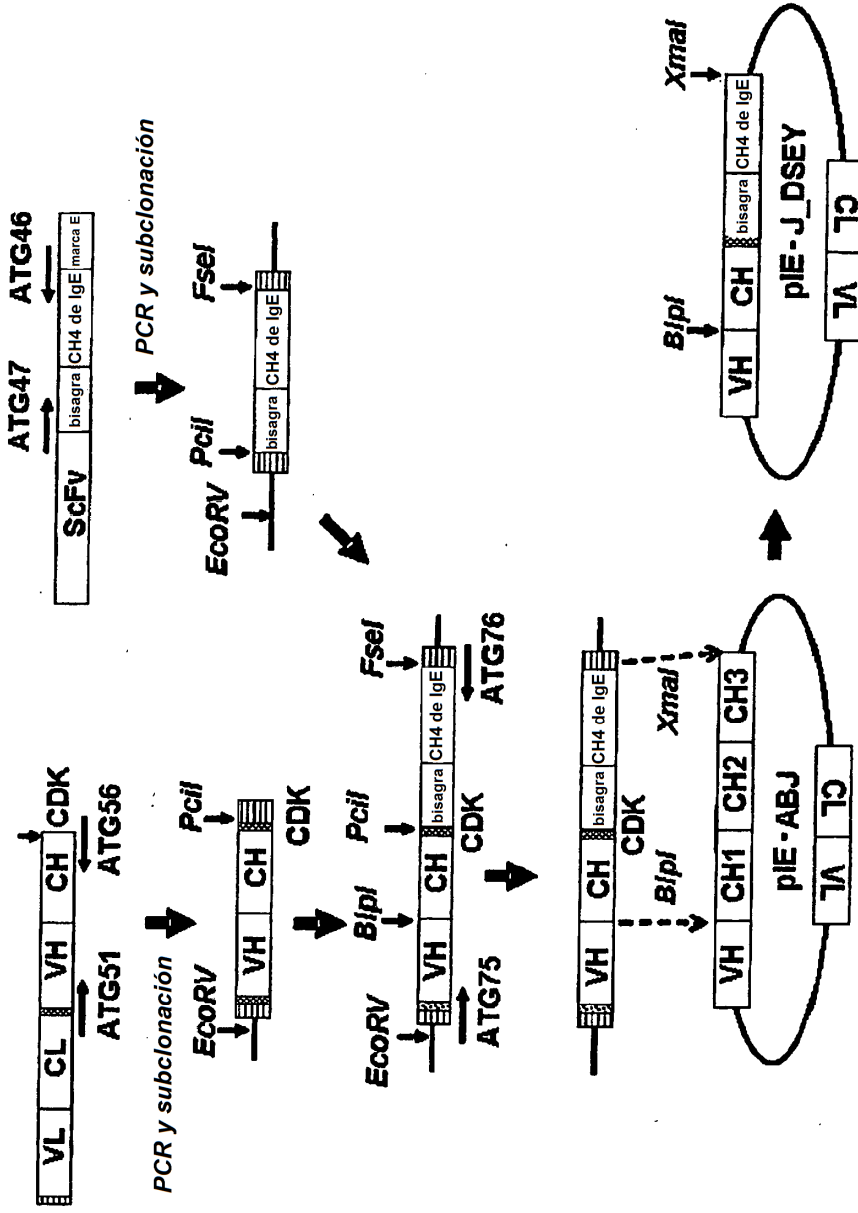


FIG. 10

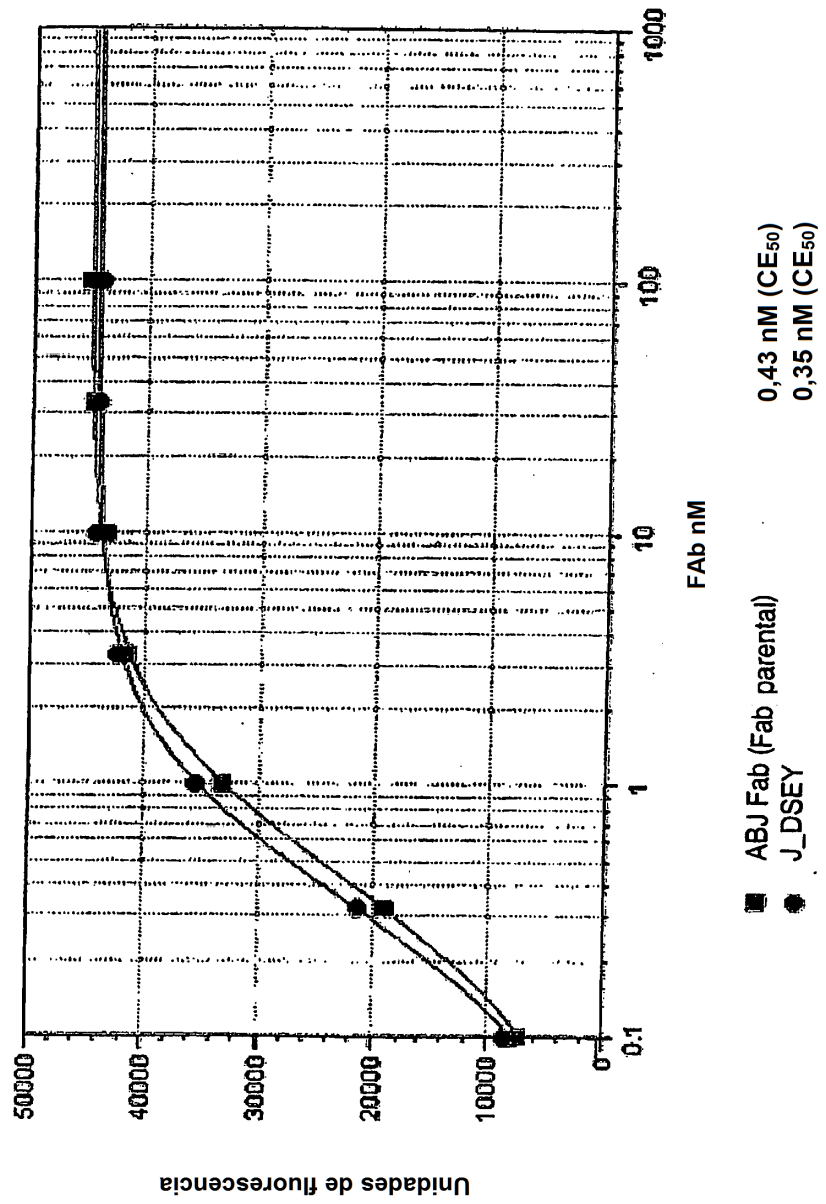
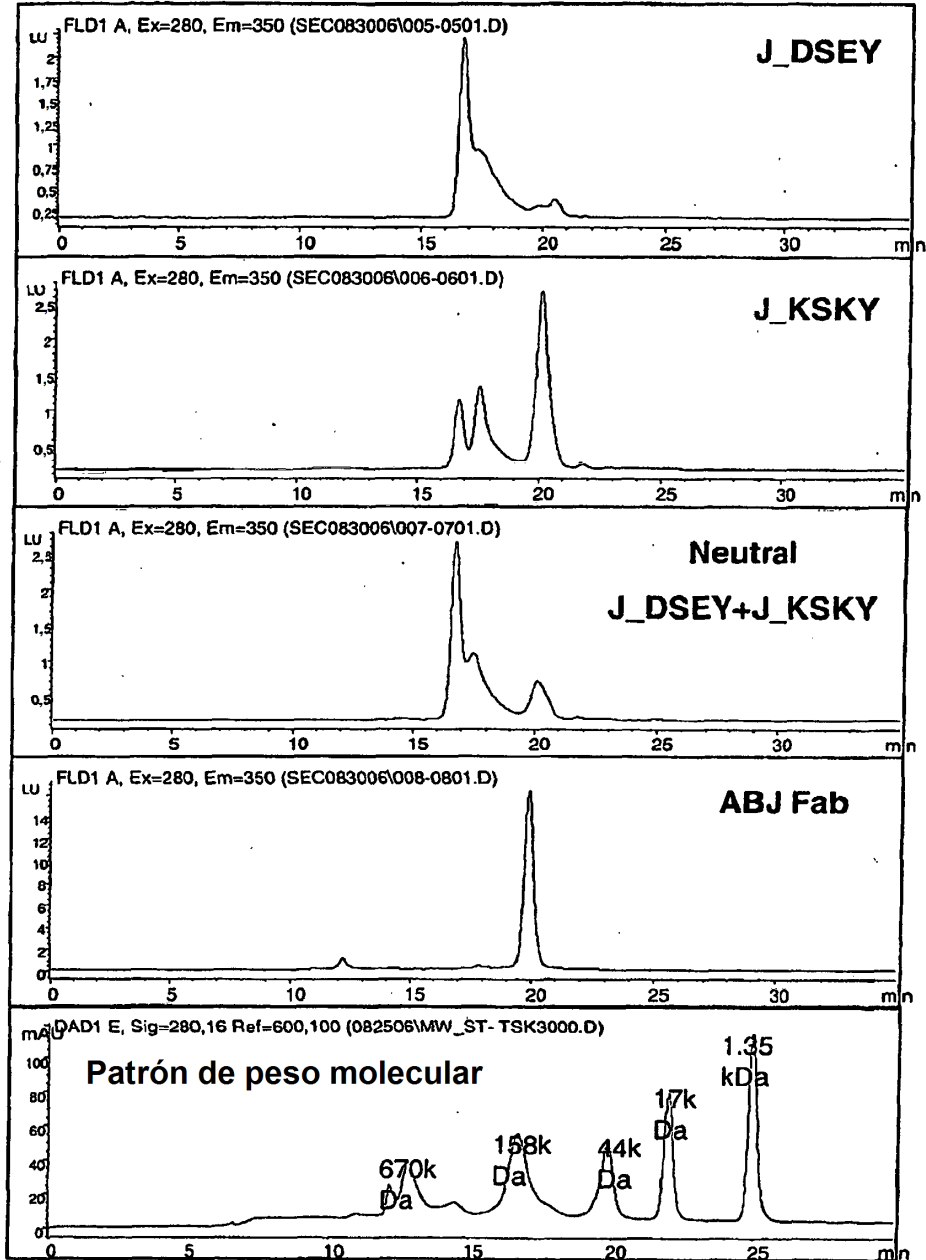


FIG. 11



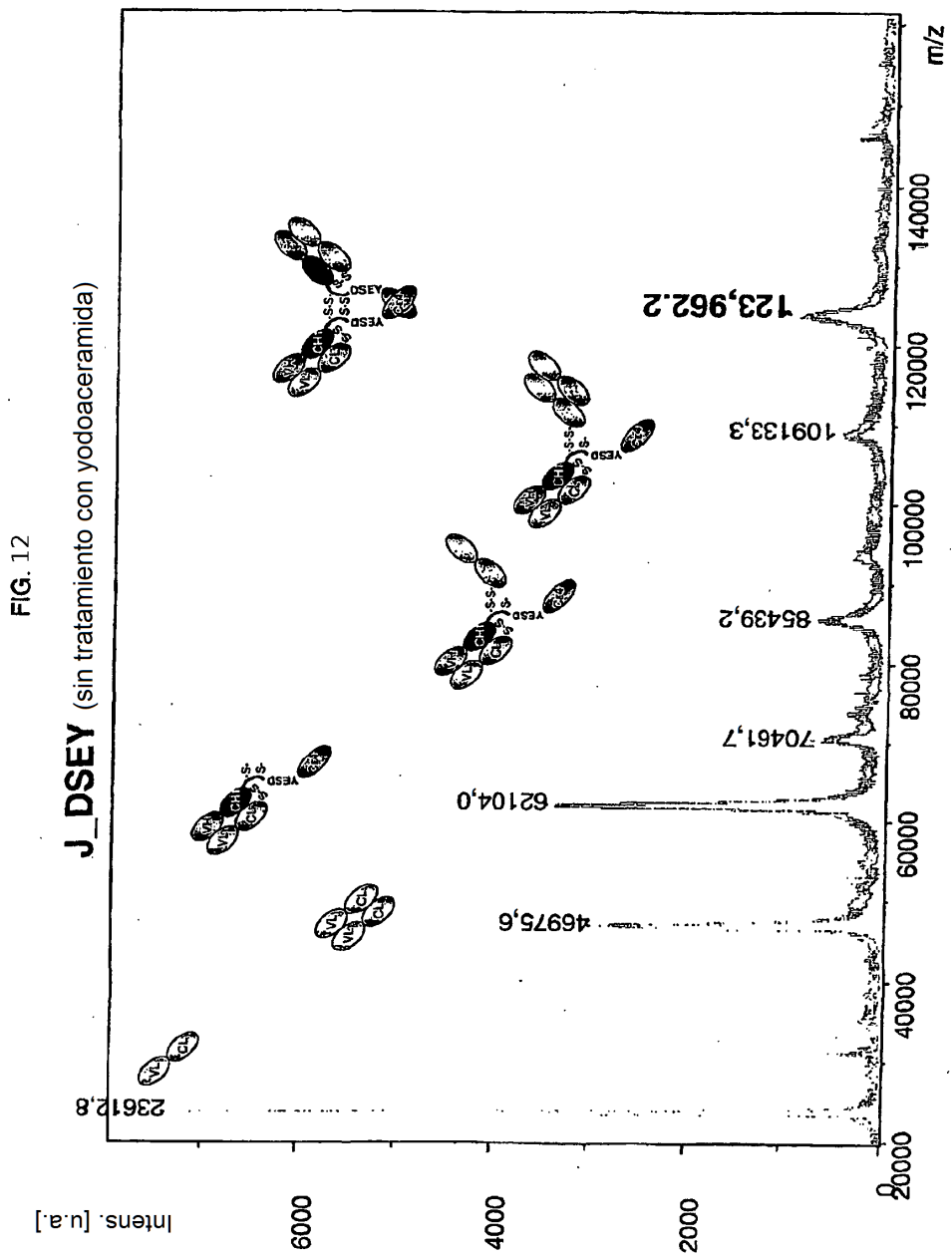


FIG. 13

