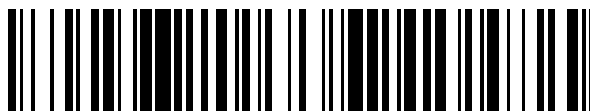


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 783**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2011 E 11700101 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2523972**

54 Título: **Anticuerpos trivalentes**

30 Prioridad:

**12.01.2010 GB 201000467**

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

**20.05.2016**

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)  
Allée de la Recherche 60  
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**ADAMS, RALPH y  
DAVE, EMMA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 570 783 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

## Anticuerpos trivalentes

- 5 La presente descripción se refiere a anticuerpos con tres sitios de unión a antígeno, a composiciones farmacéuticas que los comprenden, al uso de cada uno de los mismos en terapia y a los métodos para preparar dichos anticuerpos.
- Se conocen anticuerpos multivalentes (p. ej., documentos WO 2009/018386, EP 2050764, US 2007/071675, WO 2009/040562, WO 2009/02154, WO 2009/068628). Sin embargo, incluso aunque el concepto básico se describió hace varios años, ha habido dificultades prácticas asociadas con la explotación de la tecnología y por lo tanto no se han adoptado en sentido amplio para la preparación de productos biológicos farmacéuticos en desarrollo.
- 10 Un formato de anticuerpo no natural/no nativo puede ser difícil de expresar, lo que puede incrementar significativamente el coste de los productos a un nivel insostenible. Los formatos pueden incrementar la inmunogenicidad o reducir la estabilidad *in vivo* en comparación con un anticuerpo o un fragmento convencionales y/o pueden tener una farmacocinética no deseable.
- 15 En particular los problemas asociados con la preparación de productos homogéneos han sido una preocupación para los formatos no naturales. Si, por ejemplo, existe más de una modificación para combinar los monómeros componentes se pueden producir mezclas. Se pueden requerir métodos de purificación complicados para aislar la entidad deseada/diana a niveles de pureza satisfactorios.
- 20 Esto ha sido abordado de numerosas maneras, por ejemplo se había dicho que la utilización de conectores cortos en la producción de diacuerpos biespecíficos ayudaba a una dimerización apropiada. No obstante, los datos han demostrado que la orientación de los dominios variables puede influir en la expresión del formato y la formación de sitios de unión activos.
- 25 Un enfoque para forzar el ensamblaje en la disposición u orientación adecuadas es referido como el método del "botón en ojal", en el que un "botón" grande es introducido en el dominio VH, por ejemplo, en algunos anticuerpos intercambiando la valina 137 por el residuo grande de fenilalanina y remplazando la leucina 45 por triptófano. Se puede introducir un ojal complementario, por ejemplo en el dominio VL, en algunos anticuerpos, mutando la fenilalanina 98 a metionina y el triptófano 87 a alanina. No obstante, se observó una reducción de la actividad de unión al antígeno para varios constructos.
- 30 La presente descripción proporciona una entidad en donde se puede minimizar un emparejamiento inapropiado de los componentes.
- De este modo se proporciona un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo que comprende:
- 35 una cadena pesada que comprende un fragmento de la región constante  $C_{H1}$  localizado entre un primer y un segundo dominio variable, y un tercer dominio variable conectado directamente o indirectamente al primer o segundo dominios variables,
- 40 con la condición de que la cadena pesada solamente contiene un  $C_{H1}$  y solo contiene tres dominios variables, y una cadena ligera que comprende al menos un dominio  $C_L$  localizado entre un primer y un segundo dominios variables, y un tercer dominio variable conectado directamente o indirectamente al primer o segundo dominios variables,
- 45 con la condición de que la cadena ligera solamente contiene un dominio  $C_L$  y solamente contiene tres dominios variables, y en donde dichas cadenas pesada y ligera se alinean para proporcionar un primer sitio de unión formado por los primeros dominios variables en la cadena ligera y pesada, un segundo sitio de unión formado por los segundos dominios variables en la cadena ligera y pesada, y un tercer sitio de unión formado por los terceros dominios variables en la cadena ligera y pesada.
- 50 En una realización al menos dos de dichos tres sitios de unión son específicos para diferentes epítomos.
- En una realización se proporciona un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo que comprende:
- una cadena pesada que comprende un fragmento de la región constante  $C_{H1}$  localizado entre un primer y un segundo dominio variable que no son un par cognado, y un tercer dominio variable que no es un par cognado con el primer y segundo dominios variables, en donde dicho tercer dominio variable está conectado directamente o indirectamente al primer o segundo dominios variables,

con la condición de que la cadena pesada solamente contiene un  $C_{H1}$  y solamente contiene tres dominios variables, y

5 una cadena ligera que comprende al menos un dominio  $C_L$  localizado entre un primer y un segundo dominios variables que no son un par cognado, y un tercer dominio variable que no es un par cognado con el primer y segundo dominios variables, en donde dicho tercer dominio variable está conectado directamente o indirectamente al primer o segundo dominios variables,

con la condición de que la cadena ligera solamente contiene un dominio  $C_L$  y solamente contiene tres dominios variables, y

10 en donde dichas cadenas pesada y ligera se alinean para proporcionar un primer sitio de unión formado por los primeros dominios variables en la cadena ligera y pesada, un segundo sitio de unión formado por los segundos dominios variables en la cadena ligera y pesada, y un tercer sitio de unión formado por los terceros dominios variables en la cadena ligera y pesada.

Preferiblemente cada dominio variable en la cadena pesada es un dominio  $V_H$  y cada dominio variable en la cadena ligera es un dominio  $V_L$ .

15 El constructo de la cadena pesada de la presente descripción puede, por ejemplo ser representado como sigue:

$$V_{H1}C_{H1}L_1V_{H2}L_2V_{H3} \quad (Ia)$$

o

$$V_{H3}L_2V_{H1}C_{H1}L_1V_{H2} \quad (Ib)$$

en donde:

20  $V_{H1}$  es un primer dominio variable;

$C_{H1}$  es un dominio de la región constante  $C_{H1}$ ;

$L_1$  es un conector o un enlace;

$V_{H2}$  es un segundo dominio variable;

$L_2$  es un conector o un enlace, y

25  $V_{H3}$  es un tercer dominio variable, y

el constructo de la cadena ligera de la presente descripción puede ser representado como:

$$V_{L1}C_L L_1 V_{L2} L_2 V_{L3} \quad (IIa)$$

o

$$V_{L3} L_2 V_{L1} C_L L_1 V_{L2} \quad (IIb)$$

30  $V_{L1}$  es un primer dominio variable;

$C_L$  es un dominio de la región constante  $C_L$ ;

$L_1$  es un conector o un enlace;

$V_{L2}$  es un segundo dominio variable;

$L_2$  es un conector o un enlace; y

35  $V_{L3}$  es un tercer dominio variable; y

el par de cadena pesada y ligera se emparejan de manera que  $V_{H1}$  y  $V_{L1}$  forman un dominio de unión,  $V_{H2}$  y  $V_{L2}$  forman un dominio de unión y  $V_{H3}$  y  $V_{L3}$  forman un dominio de unión.

En una realización la presente invención proporciona un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo que comprende o consiste en:

40 una cadena pesada representada como:

$$V_{H1}C_{H1}L_1V_{H2}L_2V_{H3}$$

en donde:

$V_{H1}$  es un primer dominio variable;

$C_{H1}$  es un dominio de la región constante  $C_{H1}$ ;

$L_1$  es un conector o un enlace;

5  $V_{H2}$  es un segundo dominio variable;

$L_2$  es un conector o un enlace, y

$V_{H3}$  es un tercer dominio variable, y

una cadena ligera representada como:



10 en donde:

$V_{L1}$  es un primer dominio variable;

$C_L$  es un dominio de la región constante  $C_L$ ;

$L_1$  es un conector o un enlace;

$V_{L2}$  es un segundo dominio variable;

15  $L_2$  es un conector o un enlace; y

$V_{L3}$  es un tercer dominio variable; y

la cadena pesada y ligera se emparejan de manera que  $V_{H1}$  y  $V_{L1}$  forman un dominio de unión,  $V_{H2}$  y  $V_{L2}$  forman un dominio de unión y  $V_{H3}$  y  $V_{L3}$  forman un dominio de unión.

20 Ventajosamente, la provisión de solamente un  $C_{H1}$  en la cadena pesada y solamente un  $C_L$  en la cadena ligera facilita un emparejamiento apropiado.

**Breve descripción de las figuras**

Las Figuras 1-6 muestran secuencias de anticuerpos o componentes de cadena pesada/ligera de acuerdo con la presente invención.

25 La Figura 7 muestra un análisis SDS-PAGE de FabA-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652dsFv) (a) en condiciones reductoras y (b) en condiciones no reductoras.

En una realización la cadena pesada tiene el formato (Ia) y la cadena ligera tiene el (IIa) como se muestra más arriba.

Se pretende que anticuerpo, según se emplea en la presente memoria haga referencia al formato que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras.

30 Un componente de cadena pesada/ligera de acuerdo con la presente descripción es una cadena pesada y una cadena ligera asociada.

La cadena pesada empleada en la presente memoria es la cadena que comprende la región  $C_{H1}$ .

La cadena ligera empleada en la presente memoria comprende la región  $C_L$ .

El anticuerpo o fragmento no comprende una región  $F_c$ .

35 El componente de cadena pesada/ligera no comprende una región  $F_c$ .

Los dominios variables se proporcionan en cada cadena de manera que forman pares pre-definidos con una unión apropiada/adecuada a un antígeno diana, es decir, cada par forma un sitio de unión o dominio. Los pares de dominios variables apropiados se pueden identificar mediante cualquier método posible, por ejemplo incluyendo la generación de anticuerpos en anfitriones y el escrutinio de células B. Alternativamente, los pares apropiados se pueden identificar mediante presentación en fagos. En una realización el par de dominios variables tiene una afinidad por el antígeno diana de 100 nM o menos, tal como 50 nM o menos, en particular 1 nM o menos.

- Los métodos de presentación en fagos son conocidos en la técnica e incluyen aquellos descritos por Brinkman et al., J. Immunol. Methods, 1995, 182, 41-50; Ames et al., J. Immunol. Methods, 1995, 184, 177-186; Kettleborough et al. Eur. J. Immunol., 1994, 24, 952-958; Persic et al., Gene, 1997 187, 9-18; y Burton et al., Advances in Immunology, 1994, 57, 191-280; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; y el documento WO 95/20401; y las patentes de EE.UU. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5,821,047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5,733,743; y 5.969.108.
- Se pueden utilizar ratones transgénicos, u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, para generar anticuerpos humanizados.
- En una realización el par de dominios variables que forma un sitio de unión es un par cognado. Se pretende que par cognado, según se emplea en la presente memoria haga referencia a un par natural de dominios variables, es decir aislado de un único anticuerpo o célula de expresión de anticuerpo, tal como una célula B.
- En un ejemplo, el par cognado es un par VH/VL complementario que se une al antígeno de manera cooperativa, es decir son un par VH/VL complementario.
- Típicamente el par cognado será un par derivado de VH/VL derivado del mismo anticuerpo.
- En un ejemplo el par cognado es un par de dominios variables aislados como par de una "biblioteca de pares", tal como una biblioteca de presentación en fagos de Fab.
- En un ejemplo, el par VH/VL es mono-específico.
- Se han optimizado y/o humanizado dominios variables.
- Los dominios variables optimizados/humanizados derivados de un par cognado todavía serán considerados un par cognado después de la optimización/humanización.
- Según se emplea en la presente memoria, C<sub>L</sub> hace referencia a la porción de la región constante de la cadena ligera, que puede ser una región constante de la cadena ligera de origen natural.
- Se pretende que fusionado, según se emplea en la presente memoria haga referencia a una secuencia continua de aminoácidos que no está interrumpida, es decir conectada directamente por medio de un enlace peptídico, por ejemplo directamente a la secuencia del dominio variable o por el contrario al fragmento de la región constante y no unida por un conector. La inserción de un conector peptídico no natural en una secuencia de aminoácidos interrumpe la secuencia y de ese modo un conector peptídico que contenga una secuencia no se consideraría fusionado a las porciones relevantes juntas dentro del significado de la presente memoria descriptiva. La adición de un conector peptídico natural también se consideraría una interrupción de la secuencia de aminoácidos, si no se pudiera considerar que formara parte de la secuencia de uno o más de los componentes relevantes, tales como un dominio variable o un fragmento de la región constante.
- En una realización el anticuerpo o el componente de cadena pesada/ligera del mismo se une ávidamente al antígeno diana.
- El anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo de la presente invención comprende o consiste en 3 sitios de unión elaborado cada uno con un par VHNL.
- En una realización el anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con la presente descripción es mono-específico. Se pretende que mono-específico según se emplea en la presente memoria haga referencia al hecho de que todos los sitios de unión se unen al mismo antígeno diana. En un aspecto de esta realización todos los sitios de unión se unen al mismo epítipo o epítopos de dicho antígeno, por ejemplo, cada par VH/VL es el mismo. En una realización alternativa, al menos dos sitios de unión se unen a diferentes epítopos sobre el antígeno diana.
- En una realización un anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera de acuerdo con la presente descripción es biespecífico de manera que al menos dos sitios de unión se unen específicamente a antígenos diferentes o distintos.
- En una realización cada sitio de unión se une específicamente a antígenos diferentes o distintos, esto es, el anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera es trispecífico.
- Según se emplea en la presente memoria se pretende que se une específicamente haga referencia a un anticuerpo que tiene una elevada afinidad de unión por un antígeno diana (para el cual es específico) y que se une a antígenos para los cuales no es específico con una afinidad baja o mucho menor (o sin afinidad en absoluto). Los métodos de medición de la afinidad son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen análisis tales como BIAcore.
- Epítopos diferentes son epítopos distintos, pero pueden estar, por ejemplo, en el mismo antígeno. En una o más realizaciones, los epítopos diferentes están en antígenos diferentes.

5 En una realización cada fragmento de la región constante también está conectado a través de un péptido, por ejemplo un conector de origen artificial/no natural tal como la secuencia de la Tabla 2, a un dominio variable, por ejemplo que no es un par cognado para el dominio variable fusionado a este. De este modo, por ejemplo C<sub>H1</sub> está conectado indirectamente, tal como a través de un péptido a V<sub>H2</sub> y C<sub>L</sub> está conectado indirectamente, tal como a través de un péptido a V<sub>L2</sub>.

En una realización el tercer dominio variable de cada cadena está conectado indirectamente al segundo dominio variable en esa cadena, por ejemplo por medio de un péptido, de manera que V<sub>H2</sub> está conectado a V<sub>H3</sub> por un péptido y V<sub>L2</sub> está conectado a V<sub>L3</sub> por un péptido.

10 En una realización los dominios variables que forman un sitio de unión, (por ejemplo de un par cognado) no están conectados por un enlace disulfuro. En una realización hay enlaces no disulfuro entre los dominios variables de cualquiera de los pares de dominios variables que forman sitios de unión (por ejemplo enlaces no disulfuro entre pares cognados).

15 En una realización los dominios variables de al menos un par de dominios variables tal como un par cognado, están conectados por un enlace disulfuro, por ejemplo un enlace disulfuro está presente entre V<sub>H2</sub> y V<sub>L2</sub>. Alternativamente o adicionalmente un enlace disulfuro se encuentra presente entre V<sub>H3</sub> y V<sub>L3</sub>. Alternativamente o adicionalmente a cada uno de los mencionados anteriormente un enlace disulfuro se encuentra presente entre V<sub>H1</sub> y V<sub>L1</sub>. La presencia de al menos un enlace disulfuro entre un par de dominios variables puede minimizar la agregación y adicionalmente optimizar la estabilidad de los constructos preparados.

20 En una realización el enlace disulfuro está entre (a menos que el contexto indique lo contrario se emplea la numeración de Kabat en la lista de más abajo, en cualquier sitio que se haga referencia a la numeración de Kabat, la referencia relevante es Kabat et al., 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA):

- VH37 + VL95C véase por ejemplo Protein Science 6, 781-788 Zhu et al. (1997);
- 25 • VH44 + VL100 véanse por ejemplo; Biochemistry 33 5451-5459 Reiter et al. (1994); o Journal of Biological Chemistry Vol. 269 No. 28 págs.18327-18331 Reiter et al. (1994); o Protein Engineering, vol. 10 núm.12 págs.1453-1459 Rajagopal et al. (1997);
- VH44 + VL105 véase por ejemplo J Biochem. 118, 825-831 Luo et al. (1995);
- VH45 + VL87 véase por ejemplo Protein Science 6, 781-788 Zhu et al. (1997);
- VH55 + VL101 véase por ejemplo FEBS Letters 377 135-139 Young et al. (1995);
- 30 • VH100 + VL50 véase por ejemplo Biochemistry 29 1362-1367 Glockshuber et al. (1990);
- VH100b + VL49;
- VH98 + VL 46 véase por ejemplo Protein Science 6, 781-788 Zhu et al. (1997);
- VH101 + VL46
- 35 • VH105 + VL43 véanse por ejemplo; Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90 págs. 7538-7542 Brinkmann et al. (1993); o Proteins 19, 35-47 Jung et al. (1994) o
- VH106 + VL57 véase por ejemplo FEBS Letters 377 135-139 Young et al. (1995).

40 Los pares de aminoácidos enumerados más arriba están en posiciones que conducen al remplazado por cisteínas de tal manera que se pueden formar enlaces disulfuro. Las cisteínas pueden ser modificadas en estas posiciones mediante técnicas conocidas. La introducción de cisteínas modificadas se puede realizar utilizando cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis solapante con extensión por PCR, la mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis de casete (véase, en general, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). Los kits de mutagénesis dirigida al sitio se encuentran disponibles en el mercado, p. ej., el kit QuikChange® Site-Directed Mutagenesis (Stratagen, La Jolla, CA). La mutagénesis de casete se puede llevar a cabo basándose en Wells et al., 1985, Gene, 34:315-323. Alternativamente, se pueden elaborar mutantes mediante síntesis de genes total por medio de re-45 asociación, ligación y amplificación por PCR y clonación de oligonucleótidos solapantes.

50 Por consiguiente en una realización un par de dominios variables (VH/VL) de la presente invención se puede conectar mediante un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína, uno en VH y uno en VL, en donde la posición del par de residuos de cisteína se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y

VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH100b y VL49, VH98 y VL46, VH101 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

5 En una realización, un par de dominios variables (VH/VL) de la presente invención puede estar conectado por un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína, uno en VH y uno en VL, que están fuera de las CDR en donde la posición del par de residuos de cisteína se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH98 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

10 En una realización, un par de dominios variables (VH/VL) de la presente invención puede estar conectado mediante un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína, uno en VH y uno en VL, que están fuera de las CDR en donde la posición del par de residuos de cisteína se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH98 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

En una realización, un par de dominios variables (VH/VL) de la presente invención puede estar conectado por medio de un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína en donde el residuo de cisteína de VH está en la posición 44 y el residuo de cisteína de VL está en la posición 100.

15 Típicamente, los pares de cisteínas están modificados en aquellas posiciones de VH y VL, por consiguiente en una realización un par de dominios variables (VH/VL) de la presente invención puede estar conectado por un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína modificados, uno en VH y uno en VL, en donde la posición del par de residuos de cisteína modificados se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH100b y VL49, VH98 y VL46, VH101 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

20 En una realización un par de dominios variables (VH/VL) de la presente invención puede estar conectado por un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína modificados, uno en VH y uno en VL, que están fuera de las CDR en donde la posición del par de residuos de cisteína modificados se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH98 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

25 En una realización, el par de dominios variables (VH/VL) está conectado por un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína modificados, uno en VH y uno en VL, que están fuera de las CDR en donde la posición del par de residuos de cisteína modificados se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH98 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

30 En una realización, el par de dominios variables (VH/VL) está conectado por un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína modificados en donde el residuo de cisteína modificado de VH está en la posición 44 y el residuo de cisteína modificado de VL está en la posición 100.

En una realización, un enlace disulfuro "natural" está entre  $C_{H1}$  y  $C_L$ . El dominio  $C_L$  deriva de Kappa o Lambda. La posición natural para una cisteína "intercatenaria" formadora de enlace en el último es 214 en cKappa y cLambda humanas (numeración de Kabat 4ª edición 1987).

35 La localización exacta de la cisteína "intercatenaria" formadora de enlace en  $C_{H1}$  depende del dominio concreto realmente empleado. De este modo, por ejemplo en gamma-1 humana la posición natural de la cisteína intercatenaria formadora del enlace disulfuro se localiza en la posición 233 (numeración de Kabat 4ª edición 1987). La posición de la cisteína formadora de enlace para otros isotipos humanos tales como gamma 2, 3, 4, IgM e IgD es conocida, por ejemplo 127.

40 En una realización el anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con la descripción tiene un enlace disulfuro en una posición equivalente a, o correspondiente a la de  $C_{H1}$  y  $C_L$  de origen natural.

En una realización, la región constante que comprende  $C_H$  o  $C_L$  tiene un enlace disulfuro que está en una posición no natural. Esto se puede modificar en la molécula introduciendo uno o varios residuos de cisteína en la cadena de aminoácidos en las posiciones requeridas. Este enlace disulfuro no natural es adicional o es una alternativa al enlace disulfuro natural presente entre  $C_H$  y  $C_L$ .

45 En una o más realizaciones de la presente memoria no existen enlaces disulfuro intercatenarios en las regiones  $C_{H1}$  y  $C_L$ .

Alternativamente, se pueden proporcionar una o más realizaciones en la presente memoria con uno o más (por ejemplo dos) enlaces disulfuro entre las regiones  $C_{H1}$  y  $C_L$ , tal como en la región bisagra del mismo.

50 En ciertas realizaciones, en cada cadena, cada fragmento de la región constante se fusiona al primer dominio variable, por ejemplo  $C_{H1}$  se fusiona con  $V_{H1}$  y  $C_L$  se fusiona con  $V_{L1}$ . Esto proporciona en efecto una disposición de tipo Fab, es decir, el extremo C de  $V_{H1}$  se fusiona con el extremo N de  $C_{H1}$  y el extremo C de  $V_{L1}$  se fusiona con el extremo N de  $C_L$ .

En una realización, el fragmento de la región constante, por ejemplo en la cadena pesada, comprende un dominio  $C_{H1}$ . En una realización, el fragmento de la región constante consiste en un dominio  $C_{H1}$ .

El C<sub>H1</sub> puede derivar de dominios de IgA, IgD, IgE, IgG (tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) o IgM humanas e isotipos de los mismos.

En una realización, el fragmento de la región constante consiste en un dominio C<sub>H1</sub> que tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 66.

5 En una realización, la cadena ligera comprende un dominio C<sub>L</sub>. En una realización, la región constante en la cadena ligera consiste en un dominio C<sub>L</sub>, que es cKappa o cLambda.

En una realización, el fragmento de la región constante consiste en un dominio CL que tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 77.

10 En una realización, los componentes de cadena sencilla (un emparejamiento de cadena ligera y pesada) se unen entre sí para proporcionar un anticuerpo por medio de un enlace disulfuro, por ejemplo, mediante la incorporación de una región bisagra en la cadena pesada.

Cuando un constructo de acuerdo con la presente descripción comprende una bisagra, se pueden emplear bisagras modificadas como las de la Tabla 1.

15 Ya se han descrito numerosas regiones bisagra modificadas por ejemplo, en los documentos US 5.677.425, US6642356, WO9915549, WO2005003170, WO2005003169, WO2005003170, WO9825971 y WO2005003171 y estas se incorporan a la presente memoria como referencia. La bisagra normalmente se localizará entre el segundo dominio variable de la cadena pesada y C<sub>H1</sub>. Los ejemplos concretos de bisagras incluyen los mostrados en la Tabla 1.

**Tabla 1. Secuencias conectoras bisagra**

SEQ. ID. NO:	SECUENCIA
1	DKTHTCAA
2	DKTHTCPPCPA
3	DKTHTCPPCPATCPPCPA
4	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
5	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
6	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
7	DKTHTCCVECPCPA
8	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPCPRCPA
9	DKTHTCPSCPA

20 Se piensa que la disposición de C<sub>L</sub> en la cadena ligera y de C<sub>H1</sub> en la cadena pesada minimiza la dimerización inapropiada.

25 Los autores de la presente invención creen que al proporcionar dominios variables como pares cognados en el constructo final, esto optimiza y mantiene las propiedades de unión al antígeno del sitio de unión formado por el par relevante.

Los puentes disulfuro en los pares cognados pueden resultar ventajosos ya que ayudan a estabilizar el formato.

Los ejemplos de los conectores peptídicos adecuados se proporcionan a continuación, por ejemplo en la Tabla 2.



Tabla 2. Secuencias conectoras flexibles

SEQ. ID. NO:	SECUENCIA
10	SGGGGSE
11	DKTHTS
12	(S)GGGGS
13	(S)GGGGSGGGGS
14	(S)GGGGSGGGGS
15	(S)GGGGSGGGGS
16	(S)GGGGSGGGGS
17	AAAGSG-GASAS
18	AAAGSG-XGGGS-GASAS
19	AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS
20	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS
21	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
22	AAAGSG-XS-GASAS
23	PGGNRGTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
24	ATTTGSSPGPT
25	ATTTGS
	GS
27	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
28	GTVAAPSVFIFPPSD
29	GGGGIAPSMVGGGGS
30	GGGKVEGAGGGGGS
31	GGGSMKSHDGGGGS
32	GGGNLITIVGGGGS
33	GGGVVPSLPGGGGS
34	GGEKSIPGGGGS
35	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
36	YPRSIYIRRRHPSPLTT
37	TPSHLSHILPSFGLPTFN

SEQ. ID. NO:	SECUENCIA
38	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
39	SPA AHFPRSIPRPGPIRT
40	APGPSAPSHRSLPSRAFG
41	PRNSIHFLHPLL VAPLGA
42	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
43	SPQYPSPLTLTLPHPSL
44	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
45	LPWRTSLLPSLPLRRRP
46	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
47	VPPAPVVSLRSAHARPPY
48	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
49	PNVAHVLP LLTVPWDNLR
50	CNPLLPLCARSPAVRFTP
(S) es opcional en las secuencias 13 a 16.	

Los ejemplos de los conectores rígidos incluyen las secuencias peptídicas GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO: 88), PPPP (SEQ ID NO: 89) y PPP.

5 En una realización, el conector peptídico entre el fragmento de la región constante CH1 y el segundo dominio variable de la cadena pesada tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 67 o SEQ ID NO: 73.

En una realización, el conector peptídico entre el dominio CL y el segundo dominio variable de la cadena ligera tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 67 o SEQ ID NO: 73.

En una realización, el conector peptídico entre el segundo dominio variable de la cadena pesada y el tercer dominio variable de la cadena pesada tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 73.

10 En una realización, el conector peptídico entre el segundo dominio variable de la cadena ligera y el tercer dominio variable de la cadena ligera tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 73.

En una realización, el conector peptídico es un péptido de unión de albúmina.

Los ejemplos de los péptidos de unión de albúmina se proporcionan en el documento WO 2007/106120 e incluyen:

Tabla 3

SEQ. ID. NO:	SECUENCIA
51	DLCLRDWGCLW
52	DICLPRWGCLW
53	MEDICLPRWGCLWGD
54	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
55	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
56	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
57	EDICLPRWGCLWEDD
58	RLMEDICLPRWGCLWEDD
59	MEDICLPRWGCLWEDD
60	MEDICLPRWGCLWED
61	RLMEDICLARWGCLWEDD
62	EVRSFCTRWPAEKSCKPLRG
63	RAPESFVCYWETICFERSEQ
64	EMCYFPGICWM

5 En una realización, el constructo de acuerdo con la presente invención comprende un péptido de unión de albúmina conectada al extremo C del mismo. Esto puede ser adicional o alternativo a los conectores peptídicos de unión de albúmina.

En una realización, al menos uno de los sitios de unión se une a albúmina de suero humana.

En una realización, el primer sitio de unión se une a albúmina de suero humana.

En una realización, el segundo sitio de unión se une a albúmina de suero humana.

En una realización, el tercer sitio de unión se une a albúmina de suero humana.

10 En una realización, un dominio variable de la cadena pesada tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 68. En una realización un dominio variable de la cadena ligera tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 78.

15 Se apreciará que se pueden realizar una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos en los dominios variables del anticuerpo, proporcionados por la presente invención, sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno diana y neutralizar la actividad del mismo. El efecto de cualquier sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos puede ser sometido a ensayo fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo mediante la utilización de análisis in vitro, por ejemplo un análisis BIAcore.

En una realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende un dominio C<sub>H1</sub> y la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio C<sub>L</sub>, ya sea kappa o lambda.

20 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen adecuadamente una elevada afinidad de unión, en particular nanomolar o picomolar. La afinidad se puede medir utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo BIAcore. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 1 nM o mejor o de 100 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 50 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 40 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de

25

aproximadamente 30 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención es completamente humana o humanizada y tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor.

En una realización, el anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo comprende las secuencias proporcionadas en el SEQ ID NO: 26 y el SEQ ID NO: 75. En una realización, el anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo comprende las secuencias proporcionadas en el SEQ ID NO: 80 y el SEQ ID NO: 81. En una realización, el anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo comprende las secuencias proporcionadas en el SEQ ID NO: 82 y el SEQ ID NO: 83. En una realización, el anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo comprende las secuencias proporcionadas en el SEQ ID NO: 84 y el SEQ ID NO: 85. En una realización, el anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo comprende las secuencias proporcionadas en el SEQ ID NO: 86 y el SEQ ID NO: 87.

Si se desea un anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo para su uso en la presente invención se puede conjugar con una o más moléculas efectoras. Cabe destacar que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de dichas moléculas ligadas de tal modo que forman un único radical que puede unirse a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desea obtener un fragmento de anticuerpo ligado a una molécula efectora, éste se puede preparar mediante procedimientos químicos o de ADN recombinante convencionales en los que el fragmento de anticuerpo se liga directamente o a través de un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras a anticuerpo son bien conocidas en la técnica (véase, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2ª Ed., Robinson et al., eds., 1987, pág. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Los procedimientos químicos concretos incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO03031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido, el enlace puede obtenerse usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo tal como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745.

El término molécula efectora tal como se usa en la presente memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o naturales, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p. ej., ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden ser detectados mediante espectroscopía de RMN o ESR.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células (p. ej., que las destruya). Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracino diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos.

Las moléculas efectoras también incluyen, aunque sin limitación, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo descarbacina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (p. ej., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas), y agentes anti-mitóticos (p.ej., vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados tales como  $^{111}\text{In}$  y  $^{90}\text{Y}$ ,  $\text{Lu}^{177}$ , Bismuto $^{213}$ , Californio $^{252}$ , Iridio $^{192}$  y Tungsteno $^{188}$ /Renio $^{188}$ ; o fármacos tales como, aunque sin limitación, alquifosfocolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, aunque sin limitación, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de difteria, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$ , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, p. ej. angiostatina o endostatina, o, un modificador de la respuesta biológica tal como una linfoquina, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), factor estimulador de las colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otros factores de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, para el diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diferentes enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radioactivos, metales emisores de positrones (para uso en la tomografía de emisión de positrones), e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general

la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.741.900 para los iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico. Las enzimas idóneas incluyen la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la  $\beta$ -galactosidasa, o la acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos idóneos incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes idóneos incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes idóneos incluyen luciferasa, luciferina y aecurina; y los núclidos radiactivos adecuados incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  y  $^{99}\text{Tc}$ .

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la vida media del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o potenciar la administración de un anticuerpo a través de la barrera epitelial al sistema inmunológico. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en el documento WO 05/117984.

Cuando la molécula efectora es un polímero, en general, puede ser un polímero sintético o un polímero natural, por ejemplo un polímero de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada sustituido opcionalmente, o un polisacárido ramificado o sin ramificar, p. ej., un homo- o hetero-polisacárido.

Los sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos anteriormente mencionados incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

Los ejemplos específicos de los polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituida, poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados del mismo.

Los polímeros de origen natural específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glicógeno o derivados de los mismos.

"Derivados" tal como se usa en la presente memoria pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos de tiol tales como maleimidados y similares. El grupo reactivo puede estar unido al polímero directamente o a través de un segmento conector. Cabe destacar que el residuo de dicho grupo en algunos casos formará parte del producto, como grupo de unión entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero se puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular medio ponderal de 500 Da a 50000 Da, por ejemplo de 5000 a 40000 Da tal como de 20000 a 40000 Da. En particular, el tamaño del polímero se puede seleccionar en base al uso pretendido para el producto, por ejemplo, la capacidad para localizarse en determinados tejidos tales como tumores o prolongar la vida media en circulación (para una revisión, véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Por tanto, por ejemplo, cuando el producto se destine a abandonar la circulación y penetrar en un tejido, por ejemplo para uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de bajo peso molecular, por ejemplo con un peso molecular en torno a 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en circulación, puede ser ventajoso usar un peso molecular de polímero mayor, por ejemplo que tenga un peso molecular en el rango de 20000 Da a 40000 Da.

Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado de los mismos, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15000 Da a aproximadamente 40000 Da.

En un ejemplo, los anticuerpos para uso en la presente invención están unidos a radicales de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden estar unidas a través de cualquier cadena lateral de aminoácido disponible o grupo funcional de aminoácido terminal disponible localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo libre de tipo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo. Dichos aminoácidos puede existir de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden diseñarse en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo la Patente de Estados Unidos Núm. 5.219.996; la Patente de Estados Unidos Núm. 5.667.425; el documento WO98/25971). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. Adecuadamente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a los cuales se puede anclar la molécula efectora. Se pueden usar múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.

En una realización, una molécula de PEG se conecta con una cisteína 171 de la cadena ligera, por ejemplo véase el documento WO2008/038024 incorporado a la presente memoria como referencia.

Adecuadamente las moléculas de PEG están conectadas covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede estar ligada covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína localizado en el fragmento. El enlace covalente generalmente será un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono.

5 Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión se pueden usar moléculas efectoras activadas apropiadamente, por ejemplo derivados selectivos para tiol tales como maleimidias y derivados de cisteína. Se puede usar un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con polímero como los descritos anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo tiol tal como un éster o ácido  $\alpha$ -halocarboxílico, p. ej. yodoacetamida, una imida, p. ej., maleimida, una vinil sulfona o un disulfuro. Dichos materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles comercialmente usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG concretas incluyen 20K metoxi-PEG-amina (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

10 La presente invención también proporciona ADN aislado que codifica un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento del mismo de una cadena pesada o ligera del mismo.

En un aspecto adicional se proporciona un vector que comprende dicho ADN.

15 Los métodos generales mediante los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a *Current Protocols in Molecular Biology*, 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y al manual de Maniatis producido por Cold Spring Harbor Publishing.

En un aspecto adicional se proporciona una célula anfitriona que comprende dicho vector y/o ADN.

20 Se puede usar cualquier célula anfitriona/sistema de vector adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Se pueden usar bacterias, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos, o también se pueden usar sistemas de expresión en células anfitrionas eucariotas, por ejemplo de mamífero. Las células anfitrionas de mamífero adecuadas incluyen las células CHO, de mieloma o de hibridoma.

25 La presente invención también proporciona un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención que comprende cultivar una célula anfitriona que contiene un vector (y/o ADN) de la presente invención en condiciones adecuadas para conducir a la expresión de proteína a partir de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

30 La molécula de anticuerpo puede comprender solo un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo es necesario usar una secuencia codificante de polipéptido de cadena pesada o ligera para transfectar las células anfitrionas. Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como ligeras, la línea celular puede ser transfectada con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede usar un único vector, vector que incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.

35 Los anticuerpos y fragmentos de acuerdo con la presente descripción se expresan a un buen nivel a partir de las células anfitrionas. De este modo las propiedades de los anticuerpos y/o fragmentos contribuyen al procesamiento comercial.

Los anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o la profilaxis de una afección patológica.

40 De este modo se proporciona un anticuerpo o componente de cadena sencilla del mismo para su uso en el tratamiento, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del mismo. En una realización el anticuerpo o componente de cadena sencilla del mismo se administran como una formulación farmacéutica.

45 De este modo, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención combinada con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables. Por consiguiente se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento. Habitualmente, la composición se suministrará como parte de una composición farmacéutica esterilizada que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención adicionalmente puede comprender un coadyuvante farmacéuticamente aceptable.

50 La presente invención también proporciona un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende añadir y mezclar la molécula de anticuerpo de la presente invención junto con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

55 La molécula de anticuerpo puede ser el único principio activo de la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede estar acompañada de otros principios activos incluyendo otros ingredientes anticuerpos, por ejemplo anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1 $\beta$ , anti-linfocitos T, anti-IFN $\gamma$  o anti-LPS, o ingredientes no anticuerpos tales como xantinas. Otros ingredientes activos adecuados incluyen anticuerpos capaces de inducir tolerancia, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

- En una realización adicional el anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la descripción se emplean combinados con un agente farmacéuticamente activo adicional, por ejemplo un corticosteroide (tal como fluticasona propionato) y/o un agonista beta-2 (tal como salbutamol, salmeterol o formoterol) o inhibidores del crecimiento y la proliferación celulares (tales como rapamicina, ciclofosfamida, metotrexato) o alternativamente un inhibidor de CD28 y/o CD40. En una realización, el inhibidor es una molécula pequeña. En otra realización, el inhibidor es un anticuerpo específico para la diana.
- Las composiciones farmacéuticas comprenden adecuadamente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en la presente memoria se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, aliviar o prevenir una enfermedad o afección diana, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a través de ensayos de cultivo celular o en modelos animales, habitualmente de roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también se puede usar para determinar el margen de concentraciones apropiado y la vía de administración apropiada. A continuación, dicha información puede usarse para determinar las dosis y vías que tengan éxito para administración en los seres humanos.
- La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de enfermedad, de la salud general del sujeto, de la edad, del peso y del sexo del sujeto, de la dieta, del momento y frecuencia de administración, de las politerapias farmacológicas, de la sensibilidad a las reacciones, y de la tolerancia/respuesta al tratamiento. Dicha cantidad puede determinarse mediante experimentación convencional y se encuentra dentro del criterio del médico. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse de forma conveniente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.
- Las composiciones se pueden administrar por separado a un paciente o se pueden administrar combinadas (p. ej., de forma simultánea, secuencial o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.
- La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, del grado de inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo está siendo usada profilácticamente o para tratar una afección existente.
- La frecuencia de dosis dependerá de la vida media de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una vida media corta (p. ej., de 2 a 10 horas) puede ser necesario suministrar una o más dosis al día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una vida media larga (p. ej., de 2 a 15 días) puede que solo sea necesario administrar una dosis una vez al día, una vez a la semana o incluso una vez cada 1 ó 2 meses.
- El portador farmacéuticamente aceptable no debería inducir por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y no debería ser tóxico. Los portadores idóneos pueden ser macromoléculas grandes, de metabolización lenta, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas víricas inactivas.
- Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácidos minerales, tales como hidrocloruros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.
- Los portadores farmacéuticamente aceptables de composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, en dichas composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como humectantes o emulsionantes o sustancias tamponadoras de pH. Dichos portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, soluciones viscosas y suspensiones, para ingestión por parte del paciente.
- Las formas de administración adecuadas incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, p. ej., inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección en embolada o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede adoptar la forma de una suspensión, una solución o una emulsión en un vehículo oleaginoso o acuoso, y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede encontrarse en forma seca, para su reconstitución antes de ser usada con un líquido estéril apropiado.
- Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. No obstante, en una o más realizaciones las composiciones se adaptan para la administración a sujetos humanos.
- Adecuadamente en las formulaciones de acuerdo con la presente descripción, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoelectrico del anticuerpo o fragmento, por ejemplo si el pH de la formulación es 7, en ese caso puede ser apropiado un pl de 8-9 o superior.

Si bien no se desea estar limitado por ninguna teoría, se piensa que esto puede proporcionar básicamente una formulación final con una mejor estabilidad, por ejemplo el anticuerpo o fragmento permanecen en disolución.

5 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar mediante cualquiera de numerosas rutas incluyendo, pero no limitadas a, las rutas oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden usar hipopulverizaciones para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar en forma de inyectables, en forma de soluciones líquidas o en forma de suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas idóneas para disolución o suspensión en vehículos líquidos antes de su inyección.

La administración directa de las composiciones generalmente se realizará mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se administrará al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. El tratamiento con dosis puede corresponder a una pauta de dosis única o a una pauta de dosis múltiples.

15 Cabe destacar que el ingrediente activo de la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible de degradación en el tubo digestivo. Por tanto, si la composición va a ser administrada a través de una ruta que use el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan al anticuerpo frente a la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez absorbido del tracto gastrointestinal.

20 Se puede encontrar una explicación exhaustiva de los vehículos farmacéuticamente aceptables en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Merck Publishing Company, N. J. 1991).

En una realización la formulación se proporciona en forma de una formulación para la administración tópica incluyendo la inhalación.

25 Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles dosificadores que contienen gases propelentes o soluciones inhalables libres de gases propelentes. Los polvos inhalables de acuerdo con la descripción que contienen la sustancia activa pueden consistir solamente en las sustancias activas anteriormente mencionadas o en una mezcla de las sustancias activas anteriormente mencionadas con excipientes fisiológicamente aceptables.

30 Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (p. ej., glucosa o arabinosa), disacáridos (p. ej. lactosa, sacarosa, maltosa), oligo- y polisacáridos (p. ej. dextranos), polialcoholes (p. ej. sorbitol, manitol, xilitol), sales (p. ej. cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Los mono- o disacáridos se utilizan adecuadamente, utilización de lactosa o glucosa, concretamente, pero no exclusivamente en forma de sus hidratos.

Las partículas para el depósito en el pulmón requieren un tamaño de partícula menor de 10 micras, tal como 1-9 micras por ejemplo de 0,1 a 5  $\mu\text{m}$ , en particular de 1 a 5  $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo o fragmento) tiene una gran importancia.

35 Los gases propelentes que se pueden utilizar para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propelentes adecuados se seleccionan entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano y halohidrocarburos tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propelentes anteriormente mencionados se pueden utilizar como tales o en mezclas de los mismos.

40 Los gases propelentes particularmente adecuados son los derivados de alcanos halogenados seleccionados entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados mencionados anteriormente, TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y las mezclas de los mismos son particularmente adecuados.

45 Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente también pueden contener otros ingredientes tales como co-disolventes, estabilizadores, agentes tensioactivos (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para el ajuste del pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la técnica.

50 Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente de acuerdo con la invención pueden contener hasta 5% en peso de sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la invención contienen, por ejemplo, de 0,002 a 5 % en peso, de 0,01 a 3 % en peso, de 0,015 a 2 % en peso, de 0,1 a 2 % en peso, de 0,5 a 2 % en peso o de 0,5 a 1 % en peso de ingrediente activo.

Alternativamente las administraciones tópicas en el pulmón también pueden ser mediante la administración de una formulación en solución o suspensión líquida, por ejemplo empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (p. ej., el nebulizador Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor Pari Master(R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).



5 El anticuerpo de la invención se puede suministrar en un disolvente, p. ej., en forma de una solución o una suspensión. Se puede suspender en una solución fisiológica apropiada, p. ej., solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en la técnica pueden contener de 0,05 mg a 0,15 mg de edetato disódico, de 8,0 mg a 9,0 mg de NaCl, de 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, de 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro, y de 0,45 mg a 0,55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua de manera que alcance un pH de aproximadamente 4,0 a 5,0. Se puede emplear una suspensión, por ejemplo, anticuerpo liofilizado.

10 Las suspensiones terapéuticas o las formulaciones en solución también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen tampones (p. ej., tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (p. ej., albúmina de suero), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol, y glicerol. Las soluciones o suspensiones pueden estar encapsuladas en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación se proporcionará generalmente en una forma sustancialmente estéril empleando procedimientos de fabricación en condiciones estériles.

15 Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración del disolvente/solución tamponados utilizados para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo en la solución disolvente tamponada, y la distribución de la formulación en receptáculos estériles mediante métodos familiares para los expertos en la técnica.

20 La formulación nebulizable de acuerdo con la presente descripción se puede proporcionar, por ejemplo, en forma de unidades de una sola dosis (p. ej., recipientes o viales de plástico sellado) empaquetados en sobres de lámina de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, p. ej., 2 ml, de disolvente/solución tampón.

Se piensa que los anticuerpos de la presente descripción son adecuados para la liberación por medio de nebulización.

Se pretende que -que comprende- en el contexto de la presente memoria descriptiva signifique -que incluye-.

Donde se pueden combinar las realizaciones técnicamente apropiadas de la invención.

25 Las realizaciones descritas en la presente memoria comprenden ciertos rasgos/elementos. La descripción también se amplía para separar realizaciones que consisten en o consisten esencialmente en dichos rasgos/elementos.

La presente invención se describe adicionalmente simplemente a modo de ilustración a través de los siguientes ejemplos, que se refieren a las Figuras adjuntas, en las que:

30 Las Figuras 1-6 muestran secuencias de anticuerpos o componentes de cadena pesada/ligera de acuerdo con la presente invención.

La Figura 7 muestra análisis SDS-PAGE de FabA-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652dsFv (a) en condiciones reductoras y (b) en condiciones no reductoras.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Generación de anticuerpo FabFvFv

35 El FabFvFv se generó mediante el método de PCR solapante que conectaba una región codificante 26 gH2 Fab 3G4S 645 gH1 existente con 1-5(G4S)1189 gH1. Siendo la unión el extremo de 645 gH1 y 1-5(G4S). La región codificante anterior se clonó en el vector de expresión de mamífero UCB convencional de los autores de la presente invención bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia poliA de SV40E. El ADN se emparejó con un plásmido similar que codificaba la correspondiente cadena ligera basándose en la longitud del segundo conector (26 gL8 CK 3G4S 645 gL1 1-5G4S 1189 gL1) y se utilizó para transfectar células HEK293 en placas de 6 pocillos. Se utilizó 293fectin de Invitrogen para transfectar las células y a continuación las células se incubaron durante 6 días sobre una plataforma de movimiento oscilante a 37°C. Los sobrenadantes se cosecharon y se cuantificó la cantidad de anticuerpo secretado mediante ELISA. Los sobrenadantes se sometieron a continuación a análisis BIAcore, cuyos resultados se muestran en la Tabla 4. Las secuencias para el anticuerpo se muestran en las Figuras 1-3.

### 45 Análisis BIAcore

A26Fab es específico para OX40, 645Fv tiene especificidad para albúmina de suero humana (HSA) y 1189 tiene especificidad para IL-6.

50 Las afinidades de unión y los parámetros cinéticos para la interacción de A26Fab-645Fv-1189Fv con HSA (Jackson ImmunoResearch, 009-000-051) e IL-6 se determinaron mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) llevada a cabo en un Biacore T100 utilizando chips sensores CM5 y tampón de migración HBS-EP (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, P20 al 0,05% v/v). Las muestras de A26Fab-645Fv-1189Fv se capturaron en la superficie del chip sensor utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CH1 humano generado en la empresa. La

inmovilización covalente del anticuerpo de captura se logró mediante química de acoplamiento de amina convencional.

5 Cada ciclo de análisis consistió en capturar en primer lugar el A26Fab-645Fv-1189Fv utilizando una inyección de 1 min, antes de una fase de asociación que consistía en una inyección de 3 min con antígeno, después de lo cual la disociación se controló durante 8 min. Después de cada ciclo, la superficie de captura se regeneró con 2 x inyecciones de 1 min de HCl 40 mM seguido de 30 s de NaOH 5 mM. Las velocidades de flujo utilizadas fueron 10 µl/min para la captura, 30 µl/min para las fases de asociación y disociación, y 10 µl/min para la regeneración.

10 Las titulaciones de albúmina de suero humana se realizaron a concentraciones de 250, 125, 62,5 y 31,25 µM, las titulaciones de IL-6 se realizaron a concentraciones de 10, 5, 2,5, 1,25 y 0,625 nM. Se utilizó una celda de flujo blanco para la sustracción de referencia y se incluyeron inyecciones blanco de tampón para sustraer el ruido y la deriva del aparato.

Se determinaron los parámetros cinéticos mediante ajuste global simultáneo de los sensogramas a un modelo de unión 1:1 convencional utilizando Biacore T100 Evaluation Software v2.0.1.

**Tabla 4: Resumen de HSA e IL-6 que se unen a constructos tri-específicos**

<b>Afinidad para HSA</b>				
<b>Muestra</b>	<b>ka (1/Ms)</b>	<b>kd (1/s)</b>	<b>KD (nM)</b>	<b>Estequiometría</b>
<b>A26Fab 645Fv</b>	4,69E+04	2,69E-04	<b>5,74</b>	0,58
<b>A26Fab 645Fv 1G4S 1189Fv</b>	3,34E+04	3,79E-04	<b>11,33</b>	0,39
<b>A26Fab 645Fv 2G4S 1189Fv</b>	3,37E+04	3,89E-04	<b>11,55</b>	0,40
<b>A26Fab 645Fv 3G4S 1189Fv</b>	3,38E+04	3,92E-04	<b>11,60</b>	0,39
<b>A26Fab 645Fv 4G4S 1189Fv</b>	3,39E+04	3,96E-04	<b>11,66</b>	0,40
<b>A26Fab 645Fv 5G4S 1189Fv</b>	3,24E+04	3,93E-04	<b>12,15</b>	0,39
<b>Afinidad para IL-6</b>				
<b>Muestra</b>	<b>ka (1/Ms)</b>	<b>kd (1/s)</b>	<b>KD (nM)</b>	<b>Estequiometría</b>
<b>1189 IgG</b>	7,68E+06	4,90E-04	<b>0,06</b>	0,84
<b>A26Fab 645Fv 1G4S 1189Fv</b>	1 UR de unión			0,06
<b>A26Fab 645Fv 2G4S 1189Fv</b>	9,59E+05	7,47E-04	<b>0,78</b>	0,47
<b>A26Fab 645Fv 3G4S 1189Fv</b>	8,74E+05	7,37E-04	<b>0,84</b>	0,68
<b>A26Fab 645Fv 4G4S 1189Fv</b>	1,41E+06	7,29E-04	<b>0,52</b>	0,66
<b>A26Fab 645Fv 5G4S 1189Fv</b>	1,61E+06	7,68E-04	<b>0,48</b>	0,69

15

**Ejemplo 2**

**A26Fab-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652dsFv**

**A26Fab-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652Fv**

**A26Fab-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-870dsFv**

20 **A26Fab-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-870Fv**

La cadena pesada del FabFvFv se generó mediante el método de PCR solapante que conectaba una región codificante de cadena pesada 26 Fab 3G4S 645 Fv existente con 3G4S 652 gH1 o 3G4S 870H. De un modo similar, una región codificante de cadena ligera 26 Fab 3G4S 645 Fv existente se conectó con 3G4S 652 gL2 o 3G4S 870k. Siendo la unión el extremo de 645 Fv y el segundo 3G4S. Las secuencias se proporcionan en las Figuras 3-6. Las regiones codificantes se clonaron a continuación en el vector de expresión de mamífero UCB convencional de los autores de la presente invención bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia poliA de SV40E. Los plásmidos de ADN de cadena pesada y ligera se emparejaron apropiadamente y se utilizaron para transfectar células HEK293 en placas de 6 pocillos. Se utilizó 293fectin de Invitrogen para transfectar las células y a continuación las células se incubaron durante 6 días sobre una plataforma de movimiento oscilante a 37°C. Los sobrenadantes se cosecharon y se cuantificó la cantidad de anticuerpo secretado mediante ELISA. A continuación los sobrenadantes se sometieron a análisis BIAcore.

Las afinidades de unión y los parámetros cinéticos para la interacción de A26Fab-645Fv-652/870Fv con IL13 (R&D 213IL) y TNF (Strathmann hTNFa) se determinaron mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) conducida en Biacore 3000 utilizando chips sensores CM5 y tampón de migración HBS-EP (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005% v/v). Las muestras de A26Fab-645Fv-652/870Fv se capturaron en la superficie del chip sensor utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CH1 humano generado en la empresa. La inmovilización covalente del anticuerpo de captura se logró mediante química de acoplamiento de amina convencional.

Cada ciclo de análisis consistió en capturar primero el A26Fab-645Fv-652/870Fv utilizando una inyección de 1 min, antes de una fase de asociación que consistía en una inyección de 3 min de antígeno, después de lo cual la disociación se controló durante 15 min. Después de cada ciclo, la superficie de captura se regeneró con 2 x inyecciones de 1 min de HCl 40 mM seguidas de 30 s de NaOH 5 mM. Las velocidades de flujo utilizadas fueron 10 µl/min para la captura, 30 µl/min para las fases de asociación y disociación, y 10 µl/min para la regeneración.

Las titulaciones de IL 13 se realizaron a concentraciones de 20, 10, 5, 2,5 y 1,25 nM, las titulaciones de TNF se realizaron a concentraciones de 10, 5, 2,5, 1,25 y 0,625 nM. Se utilizó una celda de flujo blanco para la sustracción de referencia y se incluyeron inyecciones blanco de tampón para sustraer el ruido y la deriva del aparato.

Los parámetros cinéticos se determinaron mediante ajuste global simultáneo de los sensogramas resultantes a un modelo de unión 1:1 convencional utilizando Biacore 3000 Evaluation Software v3.2

**Tabla 5. La unión al antígeno se determinó mediante BIAcore**

Muestra	Antígeno	kDa	Afinidad	Estequiometría
652 IgG	IL13	12,5	Retenida	0,99
A26-645-652+DS	IL13	12,5	Doble pérdida	0,88
A26-645-652-DS	IL13	12,5	Retenida	0,95
870 Fab	TNF	54	Retenida	0,63
A26-645-870+DS	TNF	54	Doble pérdida	0,42
A26-645-870-DS	TNF	54	Doble pérdida	0,39

La Tabla 5 muestra que todas las regiones v terminales tienen afinidades que están dentro del doble del Fab parental. También tienen estequiometrías que son mayores de 0,4. Esto demuestra que las regiones v terminales tienen buenas características de unión para sus respectivos antígenos.

También se utilizó la SPR para determinar la unión de múltiples antígenos a la vez a las muestras de A26Fab-645Fv-652/870Fv en un Biacore 3000 utilizando chips sensores CM5 y tampón de migración HBS-EP (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005% v/v). Las muestras de A26Fab-645Fv-652/870Fv se capturaron en la superficie de un chip sensor utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CH1 generado en la empresa. La inmovilización covalente del anticuerpo de captura se logró mediante química de acoplamiento de amina convencional.

Cada ciclo de análisis consistió en capturar en primer lugar el A26Fab-645Fv-652/870Fv utilizando una inyección de 1 min, antes de una fase de asociación que consistía en una inyección de 3 min de uno o varios antígenos, después de lo cual se controló la disociación durante 15 min. Después de cada ciclo, la superficie de captura se regeneró con

2 x inyecciones de 1 min de HCl 40 mM seguido de 30 s de NaOH 5 mM. Las velocidades de flujo utilizadas fueron 10 µl/min para la captura, 30 µl/min para las fases de asociación y disociación, y 10 µl/min para la regeneración.

5 La respuesta de unión de los antígenos individuales a una sola concentración (Ox40/mFc 20 nM (AXXORA 1588); HSA 50 nM (Jackson ImmunoResearch, 009-000-051); IL13 20 nM (R&D 213IL) y TNF 10 nM (Strathmann hTNFa)) a A26Fab-645Fv-652/870Fv se midió en ciclos separados. La respuesta de unión de mezclas de antígenos con la misma concentración final de cada antígeno específico también se midió (IL13 20 nM/HSA 50 nM; IL13 20 nM/HSA 50 nM/Ox40 20 nM; TNF 10 nM/HSA 50 nM a TNF 10 nM/HSA 50 nM/Ox40 20 nM). Puesto que la concentración de cada antígeno es la misma en la mezcla que individualmente, la respuesta para cada componente antigénico debe ser la misma.

10 **Tabla 6: Datos de respuesta a la unión**

Constructos	Analito	UR de respuesta	Suma de respuestas de unión individuales	
			HSA+TNF	HSA+TNF+OX40
<b>A26-645-870+DS</b>	OX40	32		
	HSA	10		
	TNF	22		
	HSA TNF	32	32	
	HSA TNF OX40	63		64
<b>A26-645-870-DS</b>	OX40	31		
	HSA	11		
	TNF	21		
	HSA TNF	33	32	
	HSA TNF OX40	62		63
Constructos	Analito	UR respuesta	HSA+IL13	HSA+IL13+OX40
<b>A26-645 -652+DS</b>	OX40	39		
	HSA	11		
	IL13	15		
	HSA IL13	24	26	
	HSA IL13 OX40	65		65
<b>A26-645 -652-DS</b>	OX40	42		
	HSA	12		
	IL13	17		
	HSA IL13	29	29	
	HSA_IL13_OX40	71		71

Al comparar las unidades de respuesta para la unión de los antígenos individuales con las unidades de respuesta cuando los antígenos se añaden al mismo tiempo, se puede evaluar el efecto de la unión de un antígeno cualquiera

sobre la unión de los otros antígenos. Puesto que la suma de la unión para los antígenos individuales es la misma que para los antígenos aplicados al mismo tiempo, tiene lugar la unión concurrente de los 3 antígenos (Tabla 6). Todas las regiones v son susceptibles de unirse a sus antígenos en la misma medida con independencia de la presencia de antígenos en cualquiera de las otras regiones v.

### 5 Ejemplo 3

#### **FabA-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652dsFv**

El FabAFvFv derivó de constructos previamente generados utilizando la PCR solapante.

#### **Expresión y purificación de FabA-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652dsFv**

##### **Expresión en mamífero**

- 10 Se transfectaron células HEK293 con plásmidos de cadena pesada y ligera utilizando el reactivo de transfección 293fectin de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron el plásmido de cadena pesada de 2µg y el plásmido de cadena ligera de 2µg con 10µl de medios 293fectin y 340µl de Optimem durante 20 mins a RT. La mezcla se le añadió después a 5x10<sup>6</sup> células HEK293 en suspensión y se incubaron durante 7 días con sacudimiento a 37°C. Después de 7 días se recogieron los sobrenadantes mediante
- 15 centrifugación a 1500xg para retirar las células y a continuación se filtraron a 0,22 µm en condiciones estériles. Se determinó mediante análisis de Proteína G que el nivel de expresión era de 7,4 µg/ml

##### **Purificación en Proteína G**

- El sobrenadante de mamífero que contenía FabA-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652dsFv se concentró de ~45 ml a ~2 ml utilizando un concentrador Amicon Ultra-15 con una membrana de corte de peso molecular a 10 kDa y
- 20 centrifugación a 4000xg en un rotor oscilante. Se aplicaron 1,8 ml del sobrenadante concentrado a 1 ml/min a una columna HiTrap Protein-G FF (GE Healthcare) de 1 ml equilibrada en fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4. La columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4 y el material unido se hizo eluir con glicina/HCl 0,1 M pH 2,7. El pico de elución se recogió y el pH se ajustó a ~pH 7 con Tris/HCl 2 M pH 8,8. La elución con el pH ajustado se sometió a diafiltración en fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4 y se concentró a ~0,5 ml utilizando un
- 25 concentrador Amicon Ultra-15 con una membrana de corte de peso molecular a 10 kDa y centrifugación a 4000xg en un rotor oscilante. Se determinó mediante absorbancia a 280 nm que la concentración del FabA-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652dsFv purificado era de 72 µg/ml

##### **Análisis SDS-PAGE de FabA-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652dsFv**

- A 26 µl del FabA-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652dsFv purificado se le añadieron 4X 10 µL de tampón de migración de la muestra LDS (Invitrogen). Para la muestra no reducida, se añadieron 4 µL de NEM 100 mM y para la muestra
- 30 reducida se añadieron 4 µL de 10X tampón reductor (Invitrogen). Las muestras se sometieron a vórtice, se incubaron a 100°C durante 3 mins, se enfriaron y se centrifugaron a 12500 rpm durante 30 seg. Se cargaron 30 µl de las muestras preparadas en un gel de SDS acrilamida con Tris/Glicina al 4-20% y se hicieron correr durante 110 mins a 125V. Los geles se tiñeron con tinción de proteínas con Azul de Coomassie y se decoloraron con ácido acético al
- 35 7,5%. En condiciones reductoras, véase la Figura 7(a), el FabA-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652dsFv tiene esencialmente 2 bandas de ~55 kDa, una para cada cadena. En condiciones no reductoras, véase la Figura 7(b), la banda principal en ~116 kDa es monómero de FabA-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652dsFv mientras las bandas superiores son varias formas de multímero de FabA-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652dsFv.

**Lista de secuencias**

<110> UCB Pharma SA Adams, Ralph Dave, Emma

5 <120> Anticuerpos Multivalentes

<130> G0118-WO01

<160> 89

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Conector Bisagra

20 <400> 1

**Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala**  
1 5

25 <210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Conector Bisagra

<400> 2

**Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala**  
35 1 5 10

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

40 <213> Artificial

<220>

<223> Conector Bisagra

45 <400> 3

**Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys**  
1 5 10 15

**Pro Ala**

<210> 4

50 <211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

55 <223> Conector Bisagra

<400> 4

ES 2 570 783 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys  
 1 5 10 15

Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 20 25

5 <210> 5  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Conector Bisagra

<400> 5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu  
 1 5 10 15

Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr  
 20 25 30

15 <210> 6  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Conector Bisagra

<400> 6

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr His  
 1 5 10 15

Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr  
 20 25 30

25 <210> 7  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Conector Bisagra

<400> 7

Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 1 5 10 15

40 <210> 8  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Conector Bisagra

<400> 8

ES 2 570 783 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
1 5 10 15

Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala  
20 25

5 <210> 9  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Conector Bisagra

<400> 9

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Ser Cys Pro Ala  
1 5 10

15 <210> 10  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Conector

<400> 10

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
1 5

25 <210> 11  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Conector

35 <400> 11

Asp Lys Thr His Thr Ser  
1 5

40 <210> 12  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Conector

<400> 12

Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

50 <210> 13  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

55 <220>  
<223> Conector





<213> Artificial

<220>

<223> Conector

5

<220>

<221> rasgo\_misc

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10

<400> 18

**Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser**

**1 5 10 15**

15

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Conector

<220>

<221> rasgo\_misc

25

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> rasgo\_misc

30

<222> (12)..(12)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 19

**Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser**

35 **1 5 10 15**

**Gly Ala Ser Ala Ser**

**20**

40

<210> 20

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

45

<223> Conector

<220>

<221> rasgo\_misc

<222> (7)..(7)

50

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> rasgo\_misc

<222> (12)..(12)

55

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> rasgo\_misc

<222> (17)..(17)

60

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 20

ES 2 570 783 T3

**Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser**  
**1 5 10 15**

**Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser**  
**20 25**

- 5 <210> 21
- <211> 31
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Conector
- 15 <220>
- <221> rasgo\_misc
- <222> (7)..(7)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
- <221> rasgo\_misc
- <222> (12)..(12)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 25 <220>
- <221> rasgo\_misc
- <222> (17)..(17)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 30 <220>
- <221> rasgo\_misc
- <222> (22)..(22)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <400> 21

**Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser**  
**1 5 10 15**

**Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser**  
**20 25 30**

- 35 <210> 22
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 40 <220>
- <223> Conector
- 45 <220>
- <221> rasgo\_misc
- <222> (7)..(7)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <400> 22

**Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Ser Gly Ala Ser Ala Ser**  
**1 5 10**

- 55 <210> 23
- <211> 28
- <212> PRT
- <213> Artificial

ES 2 570 783 T3

<220>  
<223> Conector

<400> 23

5  
Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr  
20 25

<210> 24  
<211> 11  
10 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Conector

<400> 24

Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr  
1 5 10

20 <210> 25  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Conector

<400> 25

Ala Thr Thr Thr Gly Ser  
1 5

30 <210> 26  
<211> 499  
<212> PRT  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> 26gH2gamma1-CH13G4S645gH15G4S1189gH1

<400> 26

ES 2 570 783 T3

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

ES 2 570 783 T3

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly  
 210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp  
 260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp  
 275 280 285

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

Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr  
 325 330 335

Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 340 345 350

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 355 360 365

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 370 375 380

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 385 390 395 400

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Asp Met Ala Trp  
 405 410 415

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr  
 420 425 430

ES 2 570 783 T3

Pro Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe  
 435 440 445

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn  
 450 455 460

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly  
 465 470 475 480

Tyr Thr Leu Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr  
 485 490 495

Val Ser Ser

5 <210> 27  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Conector  
 <400> 27

Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Ser Pro Pro Ser Lys Glu  
 1 5 10 15

Ser His Lys Ser Pro  
 20

15 <210> 28  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Conector  
 <400> 28

Gly Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 25 1 5 10 15

30 <210> 29  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Conector  
 35 <400> 29

Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Ser Met Val Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

40 <210> 30  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Conector

ES 2 570 783 T3

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Lys Val Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

5 <210> 31  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Conector

<400> 31

15 Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Ser His Asp Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

20 <210> 32  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Conector

25 <400> 32

Gly Gly Gly Gly Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

30 <210> 33  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Conector

<400> 33

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

40 <210> 34  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Conector

50 <400> 34

Gly Gly Glu Lys Ser Ile Pro Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10

55 <210> 35  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Conector

60



ES 2 570 783 T3

<400> 35

Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Pro Pro Phe Pro Phe Gly Phe Pro Ser Val  
1 5 10 15

Arg Pro

5 <210> 36  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Conector

<400> 36

Tyr Pro Arg Ser Ile Tyr Ile Arg Arg Arg His Pro Ser Pro Ser Leu  
1 5 10 15

15 Thr Thr

<210> 37  
<211> 18  
<212> PRT  
20 <213> Artificial

<220>  
<223> Conector

25 <400> 37

Thr Pro Ser His Leu Ser His Ile Leu Pro Ser Phe Gly Leu Pro Thr  
1 5 10 15

Phe Asn

<210> 38  
30 <211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
35 <223> Conector

<400> 38

Arg Pro Val Ser Pro Phe Thr Phe Pro Arg Leu Ser Asn Ser Trp Leu  
1 5 10 15

Pro Ala

40 <210> 39  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Conector

<400> 39

50

ES 2 570 783 T3

Ser Pro Ala Ala His Phe Pro Arg Ser Ile Pro Arg Pro Gly Pro Ile  
1 5 10 15

**Arg Thr**

5 <210> 40  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Conector

<400> 40

Ala Pro Gly Pro Ser Ala Pro Ser His Arg Ser Leu Pro Ser Arg Ala  
1 5 10 15

**Phe Gly**

15 <210> 41  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Conector

<400> 41

Pro Arg Asn Ser Ile His Phe Leu His Pro Leu Leu Val Ala Pro Leu  
1 5 10 15

25 **Gly Ala**

<210> 42  
<211> 18  
<212> PRT  
30 <213> Artificial

<220>  
<223> Conector

35 <400> 42

Met Pro Ser Leu Ser Gly Val Leu Gln Val Arg Tyr Leu Ser Pro Pro  
1 5 10 15

**Asp Leu**

40 <210> 43  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Conector

<400> 43

ES 2 570 783 T3

Ser Pro Gln Tyr Pro Ser Pro Leu Thr Leu Thr Leu Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Ser Leu

5 <210> 44  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Conector

<400> 44

Asn Pro Ser Leu Asn Pro Pro Ser Tyr Leu His Arg Ala Pro Ser Arg  
 1 5 10 15

Ile Ser

15 <210> 45  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Conector

<400> 45

Leu Pro Trp Arg Thr Ser Leu Leu Pro Ser Leu Pro Leu Arg Arg Arg  
 1 5 10 15

25 Pro

<210> 46  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> Conector

35 <400> 46

Pro Pro Leu Phe Ala Lys Gly Pro Val Gly Leu Leu Ser Arg Ser Phe  
 1 5 10 15

Pro Pro

40 <210> 47  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Conector

<400> 47

ES 2 570 783 T3

Val Pro Pro Ala Pro Val Val Ser Leu Arg Ser Ala His Ala Arg Pro  
 1 5 10 15

Pro Tyr

<210> 48  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Conector

10

<400> 48

Leu Arg Pro Thr Pro Pro Arg Val Arg Ser Tyr Thr Cys Cys Pro Thr  
 1 5 10 15

Pro

<210> 49  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Conector

20

<400> 49

Pro Asn Val Ala His Val Leu Pro Leu Leu Thr Val Pro Trp Asp Asn  
 1 5 10 15

Leu Arg

<210> 50  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> Conector

30

<400> 50

35

Cys Asn Pro Leu Leu Pro Leu Cys Ala Arg Ser Pro Ala Val Arg Thr  
 1 5 10 15

Phe Pro

<210> 51  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40

<220>  
 <223> Péptido de unión de albúmina

45

<400> 51

Asp Leu Cys Leu Arg Asp Trp Gly Cys Leu Trp  
 1 5 10

50

<210> 52  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Péptido de unión de albúmina  
 <400> 52  
 10  
**Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp**  
**1 5 10**  
 <210> 53  
 <211> 15  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido de unión de albúmina  
 20 <400> 53  
**Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Gly Asp**  
**1 5 10 15**  
 25 <210> 54  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Péptido de unión de albúmina  
 <400> 54  
**Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp**  
**1 5 10 15**  
 35 **Glu Asp Asp Glu**  
**20**  
 <210> 55  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido de unión de albúmina  
 45 <400> 55  
**Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp**  
**1 5 10 15**  
**Gly Arg Ser Val**  
**20**  
 50 <210> 56  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 55 <223> Péptido de unión de albúmina



<212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 5 <223> Péptido de unión de albúmina

<400> 61

**Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Ala Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu**  
 1 5 10 15

**Asp Asp**

10 <210> 62  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Péptido de unión de albúmina

<400> 62

20 **Glu Val Arg Ser Phe Cys Thr Arg Trp Pro Ala Glu Lys Ser Cys Lys**  
 1 5 10 15

**Pro Leu Arg Gly**  
 20

<210> 63  
 <211> 20  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido de unión de albúmina

30 <400> 63

**Arg Ala Pro Glu Ser Phe Val Cys Tyr Trp Glu Thr Ile Cys Phe Glu**  
 1 5 10 15

**Arg Ser Glu Gln**  
 20

35 <210> 64  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Péptido de unión de albúmina

<400> 64

**Glu Met Cys Tyr Phe Pro Gly Ile Cys Trp Met**  
 45 1 5 10

<210> 65  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial

<220>

ES 2 570 783 T3

<223> 26 gH2

<400> 65

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

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

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

Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

5

<210> 66

<211> 103

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> gamma 1 cH1

15 <400> 66

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
100

20



ES 2 570 783 T3

<210> 67  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> 3G4S  
 <400> 67  
 10  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 <210> 68  
 <211> 119  
 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> 645 gH1  
 20  
 <400> 68  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met  
 65 70 75 80  
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr  
 85 90 95  
 Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 25 115  
 <210> 69  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 30  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> 5G4S  
 35  
 <400> 69

ES 2 570 783 T3

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 20 25

5 <210> 70  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> 1189 gH1

<400> 70

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

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

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

Ala Ser Ile Thr Pro Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg His Gly Tyr Thr Leu Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115

15 <210> 71  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> 1G4S

<400> 71

25 Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5

30 <210> 72  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> 2G4S

ES 2 570 783 T3

<400> 72

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

5 <210> 73  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> 3G4S

<400> 73

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

<210> 74  
<211> 20  
<212> PRT  
20 <213> Artificial

<220>  
<223> 4G4S

25 <400> 74

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

Gly Gly Gly Ser  
20

30 <210> 75  
<211> 472  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> 26 gL8 CK 3G4S 645gL1 5G4S 1189gL1

<400> 75

ES 2 570 783 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 210 215 220  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 225 230 235 240

ES 2 570 783 T3

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser  
 245 250 255

Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 260 265 270

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly  
 275 280 285

Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 290 295 300

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly  
 305 310 315 320

Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys  
 325 330 335

Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln  
 355 360 365

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val  
 370 375 380

Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Gly Ile Ser Asn Asp Leu Ala Trp  
 385 390 395 400

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala  
 405 410 415

Thr Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
 420 425 430

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe  
 435 440 445

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Lys Tyr Pro Trp Thr Phe Gly  
 450 455 460

Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 465 470

<210> 76  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> 26 gl8

10

<400> 76

ES 2 570 783 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 77  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Ckappa

10

<400> 77

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

15

<210> 78  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> 645 gL1

ES 2 570 783 T3

<400> 78

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn  
20 25 30

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Tyr Ser Ser Ile  
85 90 95

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

5

<210> 79

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> 1189 gL1

<400> 79

15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Gly Ile Ser Asn Asp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Thr Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Lys Tyr Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

20

<210> 80

<211> 490

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 570 783 T3

<220>

<223> 26Fab gH2 CH1-(3G4S)-645gH1ds-(3xG4S)-652gH2ds

5 <400> 80

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

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

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

Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala 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



ES 2 570 783 T3

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly  
 210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp  
 260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp  
 275 280 285

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

Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr  
 325 330 335

Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 340 345 350

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 355 360 365

Gly Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro  
 370 375 380

Thr Glu Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr  
 385 390 395 400

Asn Tyr His Val Gln Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Cys Leu Glu  
 405 410 415

ES 2 570 783 T3

Trp Leu Gly Val Met Trp Ser Asp Gly Asp Thr Ser Phe Asn Ser Val  
 420 425 430

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val  
 435 440 445

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 450 455 460

Cys Ala Arg Asp Gly Thr Ile Ala Ala Met Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 465 470 475 480

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 485 490

<210> 81  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> 26gL8 CK-(3G4S)-645gL1ds-(3xG4S)-652gL1ds

10

<400> 81

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

ES 2 570 783 T3

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

ES 2 570 783 T3

Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg  
 405 410 415

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 420 425 430

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Arg  
 435 440 445

Phe Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 450 455 460

<210> 82  
 <211> 490  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> 26gH2 CH1-(3G4S)-645gH1ds-(3xG4S)-652gH2

10

<400> 82

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

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

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

Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala 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

ES 2 570 783 T3

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly  
 210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp  
 260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp  
 275 280 285

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

Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr  
 325 330 335

Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 340 345 350

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 355 360 365

Gly Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro  
 370 375 380

Thr Glu Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr  
 385 390 395 400

Asn Tyr His Val Gln Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 405 410 415

ES 2 570 783 T3

Trp Leu Gly Val Met Trp Ser Asp Gly Asp Thr Ser Phe Asn Ser Val  
 420 425 430

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val  
 435 440 445

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 450 455 460

Cys Ala Arg Asp Gly Thr Ile Ala Ala Met Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 465 470 475 480

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 485 490

<210> 83  
 <211> 462  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> 26gL8 CK-(3G4S)-645gL1ds-(3xG4S)-652gL1

10

<400> 83

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

ES 2 570 783 T3

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

ES 2 570 783 T3

Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg  
 405 410 415

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 420 425 430

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Arg  
 435 440 445

Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 450 455 460

<210> 84  
 <211> 488  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> 26gH2 CH1-(3G4S)-645gH1ds-(3xG4S)-870ds

10

<400> 84

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

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

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

Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala 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



ES 2 570 783 T3

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly  
 210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp  
 260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp  
 275 280 285

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

Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr  
 325 330 335

Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 340 345 350

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 355 360 365

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
 370 375 380

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr  
 385 390 395 400

Asp Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu  
 405 410 415

ES 2 570 783 T3

Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp  
 420 425 430

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr  
 435 440 445

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 450 455 460

Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 465 470 475 480

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 485

<210> 85  
 <211> 463  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> 26gL8 CK-(3G4S)-645gL1ds-(3xG4S)-870ds  
 <400> 85

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

ES 2 570 783 T3

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

ES 2 570 783 T3

Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg  
 405 410 415

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 420 425 430

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile  
 435 440 445

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 450 455 460

<210> 86  
 <211> 488  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> 26gH2 CH1-(3G4S)-645gH1ds-(3xG4S)-870

10

<400> 86

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

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

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

Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala 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

ES 2 570 783 T3

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly  
 210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp  
 260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp  
 275 280 285

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

Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr  
 325 330 335

Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 340 345 350

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 355 360 365

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
 370 375 380

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr  
 385 390 395 400

Asp Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 405 410 415

ES 2 570 783 T3

Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp  
 420 425 430

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr  
 435 440 445

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 450 455 460

Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 465 470 475 480

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 485

<210> 87  
 <211> 462  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> 26gL8 CK-(3G4S)-645gL1ds-(3xG4S)-870

10

<400> 87

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

ES 2 570 783 T3

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

ES 2 570 783 T3

Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg  
405 410 415

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
420 425 430

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile  
435 440 445

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
450 455 460

<210> 88  
<211> 11  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Conector  
<400> 88

Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala  
1 5 10

15 <210> 89  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> conector  
<400> 89

25 Pro Pro Pro Pro  
1



## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo que comprenden:  
 una cadena pesada que comprende un fragmento de la región constante  $C_{H1}$  localizado entre un primer y  
 un segundo dominios variables, y un tercer dominio variable conectado directamente o indirectamente al primer o  
 5 segundo dominios variables,  
 con la condición de que la cadena pesada solamente contiene un  $C_{H1}$  y solamente contiene tres dominios variables,  
 y  
 una cadena ligera que comprende al menos un dominio  $C_L$  localizado entre un primer y un segundo dominios  
 variables, y un tercer dominio variable conectado directamente o indirectamente al primer o  
 10 segundo dominios variables,  
 con la condición de que la cadena ligera contiene solamente un dominio  $C_L$  y contiene solamente tres dominios  
 variables, y  
 en donde dichas cadenas pesada y ligera se alinean para proporcionar un primer sitio de unión formado por el  
 primer dominio variable de la cadena ligera y pesada, un segundo sitio de unión formado por el segundo dominio  
 15 variable de la cadena ligera y pesada, y un tercer sitio de unión formado por el tercer dominio variable de la cadena  
 ligera y pesada.
2. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con la  
 reivindicación 1, en donde  $C_{H1}$  está fusionado al primer dominio variable de la cadena pesada.
3. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con la  
 20 reivindicación 1 o 2, en donde  $C_L$  está fusionado al primer dominio variable de la cadena ligera.
4. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con una cualquiera  
 de las reivindicaciones 1 a 3, en donde  $C_{H1}$  está conectado indirectamente al segundo dominio variable de la cadena  
 pesada.
5. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con una cualquiera  
 25 de las reivindicaciones 1 a 4, en donde  $C_L$  está conectado indirectamente al segundo dominio variable de la cadena  
 ligera.
6. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con la  
 reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde la conexión indirecta es un conector peptídico.
7. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con una cualquiera  
 30 de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tercer dominio variable está conectado indirectamente.
8. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con la  
 reivindicación 7, en donde la conexión indirecta es un conector peptídico.
9. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con una cualquiera  
 35 de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el tercer dominio variable de la cadena pesada y/o ligera está conectado allí  
 al primer dominio variable.
10. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con una  
 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el tercer dominio variable de la cadena pesada y/o ligera está  
 conectado allí al segundo dominio variable.
11. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con una  
 40 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde cada sitio de unión está formado por un par de dominios  
 variables VH/VL que es un par cognado.
12. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con una  
 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde cada sitio de unión está formado por un par de dominios  
 variables VH/VL que es un par VH/VL complementario que se une al antígeno de manera co-operativa.
- 45 13. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con una  
 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde los dominios variables de al menos un sitio de unión están  
 conectados por un enlace disulfuro.

14. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde los segundos dominios variables que forman el segundo sitio de unión están estabilizados por un enlace disulfuro.
- 5 15. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde los terceros dominios variables que forman el tercer sitio de unión están estabilizados por un enlace disulfuro.
16. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el  $C_{H1}$  de la cadena pesada está conectado al  $C_L$  de la cadena ligera por un enlace disulfuro.
- 10 17. Una proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 16, en donde  $C_{H1}$  no comprende una región bisagra.
18. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que es monoespecífico, biespecífico o triespecífico.

**Figura 1**  
**Cadena pesada**

Secuencia codificante de **26 gH2 gamma 1-CH1 3G4S 645 gH1 5G4S 1189 gH1** (SEQ ID NO:26)  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTY  
 YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTTLTVSS  
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGGSGGGGSGGGGS  
 EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIHWASGTTFY  
 ATWAKGRFTISRDTTIVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTTLTV  
 SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFND  
 YDMAWVRQAPGKCLEWVASITPSGGGTYYRDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA  
 EDTAVYYCARHGTYLTDYFEYWGQGTMTVSS

**26 gH2** (SEQ ID NO:65)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTY  
 YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTTLTVSS

**Gamma 1 CH1** (SEQ ID NO:66)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

**3 (G4S)** (SEQ ID NO:67)

SGGGGSGGGGSGGGGS

**645 gH1** (SEQ ID NO:68)

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIHWASGTTFY  
 ATWAKGRFTISRDTTIVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTTLTV  
 SS

**5(G4S)** (SEQ ID NO:69)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

**1189 gH1** (SEQ ID NO:70)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYDMAWVRQAPGKCLEWVASITPSGGGT  
 YYRDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGTYLTDYFEYWGQGTMTV  
 TVSS

**Segundo conector puede ser 1-5(G4S)**

**1(G4S)** (SEQ ID NO:71)

GGGGS

**2(G4S)** (SEQ ID NO:72)

GGGSGGGGS

**3(G4S)** (SEQ ID NO:73)

GGGSGGGGSGGGGS

**4(G4S)** (SEQ ID NO: 74)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

**Figura 2**

**Cadena ligera**

Secuencia codificante de **26 gL8 CK 3G4S 645 gL1 5G4S 1189 gL1** (SEQ ID NO:75)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPS  
 RFSASGSGTDSTLTISSLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL  
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQS  
 PSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFKGS  
 SGIDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGG  
 GSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASEGISNDLAWYQQKPGKAPKLLIYDAT  
 RLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYSYKYPWTFGCGTKLEIK

**26 gL8** (SEQ ID NO:76)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPS  
 RFSASGSGTDSTLTISSLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGKVEIK

**CK** (SEQ ID NO:77)

RIVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
 DSKSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**3(G4S)** (SEQ ID NO:67)

SGGGSGGGGSGGGGS

**645 gL1** (SEQ ID NO:78)

DIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVP  
 SRFKGS GSGIDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITFGCGTKVEIKR

**5(G4S)** (SEQ ID NO:69)

GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

**1189 gL1** (SEQ ID NO:79)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASEGISNDLAWYQQKPGKAPKLLIYDATRLQDGVPS  
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYSYKYPWTFGCGTKLEIK

**Segundo conector puede ser 1-5(G4S)**

**1(G4S)** (SEQ ID NO:71)

GGGS

**2(G4S)** (SEQ ID NO:72)

GGGSGGGGS

**3(G4S)** (SEQ ID NO:73)

GGGSGGGGSGGGGS

**4(G4S)** (SEQ ID NO:74)

GGGSGGGGSGGGGSGGGGS

**Figura 3 A26Fab-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652dsFv**

**Cadena pesada**

**26 gH2 CH1 3G4S 645 gH1 ds 3G4S 652 gH2 ds (SEQ ID NO:80)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTY  
 YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLVTVSS  
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKKSCSGGGGSGGGGSGGGGS  
 EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGK~~CLEWIGIHWASGTTFY  
 ATWAKGRFTISR~~STTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLVT~~  
 VSSGGGSGGGGSGGGGSQVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTNYHVQWIRQPP  
 GKCLEWLGMWSDGDTSFNSVLKSRLTISRDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARD  
 GTIAAMDYFDYWGQGTLVTVSS

**Cadena ligera**

**26 gL8 CK 3G4S 645 gL1 ds 3G4S 652 gL1 ds (SEQ ID NO:81)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPS  
 RFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL  
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQS  
 PSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFKGS  
 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSDI  
 QMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASEDISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYHTSRLQDGVPSRF  
 SSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYRFPPLTFGCGTKVEIKR

**Figura 4: A26Fab-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-652Fv**

**Cadena pesada**

**26 gH2 CH1 3G4S 645 gH1 ds 3G4S 652 gH2 (SEQ ID NO:82)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTY  
YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLLTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGGSGGGGSGGGGS  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLNYAINWVRQAPGKCLEWIGIHWASGTTFY  
ATWAKGRFTISRDTTIVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLLTV  
VSSGGGGSGGGGSGGGGSQVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTNYHVQWIRQPP  
GKALEWLVGMWSDGDTSFNSVLKSRILTISRDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCARD  
GTIAAMDYFDYWGQGTLLTVSS

**Cadena ligera**

**26 gL8 CK 3G4S 645 gL1 ds 3G4S 652 gL1 (SEQ ID NO:83)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPS  
RFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL  
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQS  
PSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFKGS  
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSDI  
QMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASEDISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYHTSRLQDGVPSRF  
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYRFPPLTFGGGTKVEIK

**Figura 5: A26Fab-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-870dsFv**

**Cadena pesada**

**26 gH2 CH1 3G4S 645 gH1 ds 3G4S 870 ds (SEQ ID NO:84)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS**C**AASGFTFTNYGIHWIRQAPGK**G**LEWVASISPSGGLTY  
 YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQ**M**NSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQ**G**TLTVSS  
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS**G**VHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGGSGGGGSGGGGS  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS**C**AVSGIDLSNYAINWVRQAPGK**C**LEWIGIIWASGTTFY  
 ATWAKGRFTISRDTTVY**L**Q**M**NSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQ**G**TLTVT  
 SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS**C**AASGYVFTDYGMNWVRQA  
 PGK**C**LEWMGWINTYIGEPYADSVKGRFTFSLDTSKSTAYLQ**M**NSLRAEDTAVYYC**A**R  
 GYRSYAMDYWGQ**G**TLTVSS

**Cadena ligera**

**26 gL8 CK 3G4S 645 gL1 ds 3G4S 870 ds (SEQ ID NO:85)**

DIQMTQSPSSLSASV**G**DRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPS  
 RFSASGGTDSTLTISS**L**QPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGG**T**KVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
 DEQLKSGTASV**V**CLLN**F**YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK**D**STYLS**S**TL  
 TSKADYEKHKVYACEV**T**HQGLSSPVTKSFNRGEC**S**GGGGSGGGGSGGGGSDIV**M**TQ**S**  
 PSSVSASV**G**DRVTITCQSSPSVWSN**F**LSWYQQKPGKAPKLLIYEASKL**T**SGVPSR**F**KG**S**G  
 SGTDFLTISS**L**QPEDFATYYCGGGYSSISDTTFG**C**G**T**KVEIKGGGGSGGGGSGGGGSDI  
 QMTQSPSSLSASV**G**DRVTITCKASQ**N**VGT**N**VAWYQQKPGKAPKAL**I**YSASFLYSGV**P**YR  
 FSGSGGTDFTLTISS**L**QPEDFATYYCQQYNIYPLTFG**C**G**T**KVEIKR

**Figura 6: A26Fab-(3xG4S)-645dsFv-(3xG4S)-870Fv**

**Cadena pesada**

**26 gH2 CH1 3G4S 645 gH1 ds 3G4S 870 (SEQ ID NO:86)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGGLTY  
YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLVTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGGSGGGGSGGGGS  
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIHWASGTFY  
ATWAKGRFTISRDTTVYLMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTV  
SSGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMNWVRQA  
PGKLEWMGWINTYIGEPYADSVKGRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR  
GYRSYAMDYWGQGLVTVSS

**Cadena ligera**

**26 gL8 CK 3G4S 645 gL1 ds 3G4S 870 (SEQ ID NO:87)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPKAPKLLIYNANTLHTGVPS  
RFSASGSGTDSTLTISSLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL  
TLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQS  
PSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFKGS  
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSDI  
QMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPKAPKALIYSASFLYSGVPYR  
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNIYPLTFGGGTKVEIK



Figura 7

