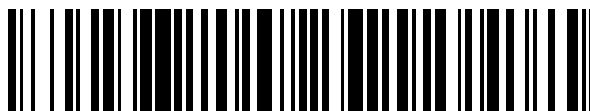


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 306**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2012 PCT/US2012/030948**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12135345**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2012 E 12716818 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2691416**

54 Título: **Proteínas de unión similares a anticuerpos con regiones variables duales con una orientación de entrecruzamiento de la región de unión**

30 Prioridad:

**28.03.2011 US 201161468276 P**

**14.11.2011 FR 1160311**

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

**02.11.2016**

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)**

**54, rue La Boétie**

**75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BAURIN, NICOLAS;**

**BEIL, CHRISTIAN;**

**CORVEY, CARSTEN;**

**LANGE, CHRISTIAN;**

**LI, DANXI;**

**MIKOL, VINCENT;**

**STEINMETZ, ANKE y**

**RAO, ERCOLE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 588 306 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

Proteínas de unión similares a anticuerpos con regiones variables duales con una orientación de entrecruzamiento de la región de unión

## CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere a proteínas de unión similares a anticuerpos que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno, en el que cada uno de los pares de polipéptidos que forman la proteína de unión similar a anticuerpo posee dominios variables doble que tienen una orientación de entrecruzamiento. También se describen métodos para preparar tales proteínas de unión similares a antígeno.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Anticuerpos IgG que se producen de forma natural son bivalentes y monoespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos que tienen especificidades de unión para dos antígenos diferentes se pueden producir utilizando tecnologías recombinantes y se prevé que tengan amplias aplicaciones clínicas. Es bien sabido que las moléculas completas de anticuerpos IgG son moléculas en forma de Y que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada una de las cadenas ligeras se compone de dos dominios, el dominio N-terminal, conocido como el dominio (o región) variable o  $V_L$  y el dominio C-terminal, conocido como el dominio constante (o  $C_L$ ) (dominio kappa constante ( $C_K$ ) o lambda constante ( $C_\lambda$ )). Cada una de las cadenas pesadas consiste en cuatro o cinco dominios, dependiendo de la clase del anticuerpo. El dominio N-terminal es conocido como el dominio (o región) variable (o  $V_H$ ), que es seguido por el primer dominio constante (o  $C_{H1}$ ), la región de bisagra, y después el segundo y tercer dominios constantes (o  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ). En un anticuerpo ensamblado, los dominios  $V_L$  y  $V_H$  se asocian para formar un sitio de unión al antígeno. También los dominios  $C_L$  y  $C_{H1}$  se asocian juntos para mantener una cadena pesada asociada con una cadena ligera. Los dos heterodímeros de cadena ligera-pesada se asocian entre sí mediante la interacción de los dominios  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$  y la interacción entre las regiones de bisagra en las dos cadenas pesadas.

- 25 Se sabe que la digestión proteolítica de un anticuerpo puede conducir a la producción de fragmentos de anticuerpos (Fab y Fab2). Tales fragmentos del anticuerpo entero pueden exhibir actividad de unión a antígeno. Los fragmentos de anticuerpos también se pueden producir de forma recombinante. Se pueden obtener Fragmentos Fv, que consisten solamente en los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras asociadas entre sí. Estos fragmentos Fv son monovalentes para la unión de antígeno. Los fragmentos más pequeños tales como dominios individuales variables (anticuerpos de dominio o dABs Ward *et al.*, 1989, *Nature* 341 (6242): 544-46), regiones determinantes de la complementariedad o CDR individuales (Williams *et al.*, 1989, *Proc Natl. Acad Sci. U.S.A.* 86 (14): 5537-41) también han demostrado conservar las características de unión del anticuerpo parental, aunque la mayoría de los anticuerpos que se producen de forma natural generalmente necesitan tanto una  $V_H$  como una  $V_L$  para conservar una potencia unión completa.

- 35 Construcciones de fragmento de cadena sencilla (scFv) comprenden un dominio  $V_H$  y un dominio  $V_L$  de un anticuerpo contenido en una única cadena de polipéptido, en donde los dominios están separados por un enlazador flexible de una longitud suficiente (más de 12 residuos aminoácidos), que fuerza una interacción intramolecular, lo que permite un auto-ensamblaje de los dos dominios en un sitio de unión a epítopo funcional (Bird *et al.*, 1988, *Science* 242 (4877): 423-26). Estas pequeñas proteínas (PM ~ 25.000 Da) generalmente conservan la especificidad y afinidad por su antígeno en un solo polipéptido y pueden proporcionar un bloque de construcción conveniente para moléculas más grandes, específicas de antígeno.

- 45 Una ventaja de utilizar fragmentos de anticuerpos en lugar de anticuerpos enteros en diagnóstico y terapia se encuentra en su tamaño más pequeño. Son probablemente menos inmunogénicos que los anticuerpos enteros y más capaces de penetrar en los tejidos. Una desventaja asociada con el uso de tales fragmentos es que tienen solamente un sitio de unión a antígeno, lo que conduce a una avidéz reducida. Además, debido a su pequeño tamaño, que se borra muy rápido a partir del suero y, por lo tanto, muestran una semi-vida corta.

- 50 Ha sido de interés producir anticuerpos biespecíficos (BsAbs) que combinan los sitios de unión a antígeno de dos anticuerpos dentro de una sola molécula y que, por lo tanto, serían capaces de unirse a dos antígenos diferentes simultáneamente. Además de las aplicaciones con fines de diagnóstico, tales moléculas allanan el camino para nuevas aplicaciones terapéuticas, p. ej., mediante la reorientación de sistemas efectores potentes a las zonas enfermas (en donde las células cancerosas a menudo desarrollan mecanismos para suprimir respuestas inmunes normales desencadenadas por anticuerpos monoclonales tal como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)), o mediante el aumento de las actividades neutralizantes o estimulantes de los anticuerpos. Este potencial fue reconocido desde el principio, dando

lugar a una serie de enfoques para la obtención de dichos anticuerpos biespecíficos. Intentos iniciales para acoplar las especificidades de unión de dos anticuerpos completos contra diferentes antígenos diana con fines terapéuticos utilizaban moléculas de heteroconjugados fusionadas químicamente (Staerz *et al.*, 1985, *Nature* 314 (6012): 628-31).

5 Los anticuerpos biespecíficos se hicieron originalmente mediante la fusión de dos hibridomas, cada uno capaz de producir una inmunoglobulina diferente (Milstein *et al.*, 1983, *Nature* 305 (5934): 537-40), pero la complejidad de las especies (hasta diez especies diferentes) producidas en cultivo celular hicieron la purificación difícil y costosa. George *et al.*, 1997, THE ANTIBODIES 4: 99-141 (Capra *et al.*, comp., Harwood Academic Publishers)). Utilizando este formato, un anticuerpo IgG2a de ratón y un anticuerpo IgG2b de rata se produjeron juntos en la misma célula  
10 (p. ej., ya sea como una fusión cuádrupla de dos hibridomas, o en células CHO modificadas por ingeniería). Debido a que las cadenas ligeras de cada uno de los anticuerpos se asocian preferentemente con las cadenas pesadas de sus especies afines, se ensamblan tres especies principales de anticuerpo: los dos anticuerpos parentales, y un heterodímero de los dos anticuerpos comprenden un par de cadenas pesada/ligera de cada uno, asociándose a través sus porciones Fc. El heterodímero deseado puede purificarse a partir de esta mezcla debido a que sus propiedades de unión a la Proteína A son diferentes de las de los anticuerpos parentales: IgG2b de rata no se une a la Proteína A, mientras que la IgG2a de ratón sí lo hace. En consecuencia, el heterodímero ratón-rata se une a Proteína A, pero eluye a un pH más alto que el homodímero de IgG2a de ratón, y esto hace posible la purificación selectiva del heterodímero biespecífico (Lindhofer *et al.*, 1995, *J. Immunol* 155 (1): 219-25). El heterodímero biespecífico resultante es totalmente no humano, por lo tanto es altamente inmunogénico, lo que podría tener  
15 efectos secundarios perjudiciales (p. ej., reacciones "HAMA" o "HARA") y/o neutralizan la terapéutica. Quedaba una necesidad de biespecíficos modificados por ingeniería con propiedades superiores que se puedan producir fácilmente en un alto rendimiento del cultivo de células de mamífero.

A pesar de los prometedores resultados obtenidos utilizando heteroconjugados o anticuerpos biespecíficos producidos a partir de la fusión de células como se cita anteriormente, varios factores les hacen poco prácticos para  
25 aplicaciones terapéuticas a gran escala. Tales factores incluyen: la rápida eliminación de los heteroconjugados *in vivo*, las técnicas intensivas de laboratorio requeridas para la generación de cualquier tipo de molécula, la necesidad de una purificación extensiva de heteroconjugados lejos de los homoconjugados o anticuerpos mono-específicos, y los bajos rendimientos obtenidos en general.

La ingeniería genética ha sido utilizada con frecuencia cada vez mayor para diseñar, modificar y producir anticuerpos o derivados de anticuerpo con un conjunto deseado de propiedades de unión y funciones efectoras. Se ha desarrollado una diversidad de métodos recombinantes para la producción eficiente de BsAbs, tanto como fragmentos de anticuerpos (Carter *et al.*, 1995, *J. Hematother* 4(5):463-70; Pluckthun *et al.*, 1997, *Immunotechnology* 3(2): 83-105; Todorovska *et al.*, 2001, *J. Immunol Methods* 248(1-2): 47-66) y los formatos de IgG de longitud completa (Carter, 2001, *J. Immunol Methods* 248(1-2): 7-15).

35 La combinación de dos scFv diferentes resulta en formatos de BsAb con masa molecular mínima, denominado sc-BsAbs o Ta-scFv (Mack *et al.*, 1995, *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A.* 92(15): 7021-25; Mallender *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 269(1): 199-206). BsAbs se han construido fusionando genéticamente dos scFvs a una funcionalidad de dimerización tal como una cremallera de leucina (Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148 (5): 1547-53; de Kruij *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271(13): 7630-34).

40 Los diacuerpos son pequeños fragmentos de anticuerpos bivalentes y biespecíficos. Los fragmentos comprenden un  $V_H$  conectado a un  $V_L$  en la misma cadena de polipéptido, mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto (menos de 12 residuos aminoácidos) para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Los dominios son forzados a emparejarse de manera intermolecular con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Estos fragmentos de anticuerpos diméricos, o "diacuerpos", son  
45 bivalentes y biespecíficos (Holliger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (14): 6444-48). Los diacuerpos son de un tamaño similar a un fragmento Fab. Cadenas de polipéptidos de dominios  $V_H$  y  $V_L$  se unieron con un enlazador de entre 3 y 12 residuos de aminoácidos forman predominantemente dímeros (diacuerpos), mientras que con un enlazador de entre 0 y 2 residuos aminoácido predominan trímeros (triacuerpos) y tetrameros (tetracuerpos). Además de la longitud del enlazador, el patrón exacto de oligomerización parece depender de la composición, así como de la orientación de los dominios variables (Hudson *et al.*, 1999, *J. Immunol Methods* 231(1-2): 177-89). La  
50 predictibilidad de la estructura final de las moléculas de diacuerpo es muy pobre.

Aunque sc-BsAb y construcciones basadas en diacuerpos exhiben un interesante potencial clínico, se demostró que tales moléculas asociadas de forma no covalente no son suficientemente estables en condiciones fisiológicas. La estabilidad global de un fragmento scFv depende de la estabilidad intrínseca de los dominios  $V_L$  y  $V_H$ , así como de la  
55 estabilidad de la interfaz del dominio. Una estabilidad insuficiente de la interfaz  $V_L$  y  $V_H$  de fragmentos scFv a menudo ha sido sugerida como una causa principal de la inactivación irreversible de scFv, ya que la apertura transitoria de la interfaz, que fuese permitida por el enlazador peptídico, expone parches hidrofóbicos que favorecen

la agregación y, por lo tanto, inestabilidad y un pobre rendimiento de la producción. Wörn *et al.*, 2001, *J. Mol. Biol.* 305(5): 989-1010).

Un método alternativo de fabricación de proteínas de unión a antígeno bivalentes biespecíficas a partir de dominios  $V_H$  y  $V_L$  se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.989.830. Configuraciones de doble cabeza y Fv dual de este tipo se obtienen mediante la expresión de un vector bicistrónico, que codifica dos cadenas polipeptídicas. En la configuración de Fv Dual, los dominios variables de dos anticuerpos diferentes se expresan en una orientación en tándem en dos cadenas separadas (una cadena pesada y una cadena ligera), en donde una cadena polipeptídica tiene dos veces un  $V_H$  en serie separados por un enlazador peptídico ( $V_{H1}$ -enlazador- $V_{H2}$ ) y la otra cadena polipeptídica consiste en dominios  $V_L$  complementarios conectados en serie por un enlazador peptídico ( $V_{L1}$ -enlazador- $V_{L2}$ ). En la configuración de doble cabeza de entrecruzamiento, los dominios variables de dos anticuerpos diferentes se expresan en una orientación en tándem en dos cadenas polipeptídicas separadas (una cadena pesada y una cadena ligera), en donde una cadena polipeptídica tiene dos veces un  $V_H$  en serie separado por un enlazador peptídico ( $V_{H1}$ -enlazador- $V_{H2}$ ) y la otra cadena polipeptídica consiste en dominios  $V_L$  complementarios conectados en serie por un enlazador peptídico en la orientación opuesta ( $V_{L2}$ -enlazador- $V_{L1}$ ). El modelado molecular de las construcciones sugirió que el tamaño del enlazador fuese lo suficientemente grande para abarcar 30-40 Å (15-20 residuos aminoácidos).

El aumento de la valencia de un anticuerpo es de interés, ya que mejora la afinidad funcional de ese anticuerpo debido al efecto de avidéz. Complejos de proteínas polivalentes (PPC) con una valencia incrementada se describen en la Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2005/0003403 A1. Los PPCs comprenden dos cadenas de polipéptidos, en general dispuestas lateralmente entre sí. Cada una de las cadenas de polipéptidos comprende típicamente tres o cuatro "regiones v", que comprenden secuencias de aminoácidos capaces de formar un sitio de unión al antígeno cuando se combina con una región v correspondiente en la cadena polipeptídica opuesta. Se pueden utilizar hasta aproximadamente seis "regiones v" en cada una de las cadenas polipeptídicas. Las regiones v de cada una de las cadenas polipeptídicas están conectadas linealmente entre sí y pueden estar conectados por regiones de enlace intercaladas. Cuando se disponen en forma del PPC, las regiones v de cada una de las cadenas polipeptídicas forman sitios individuales de unión al antígeno. El complejo puede contener una o varias especificidades de unión.

Una estrategia fue propuesta por Carter *et al.* (Ridgway *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9(7): 617-21; Carter, 2011, *J. Immunol. Methods* 248 (1-2): 7-15) para producir un heterodímero Fc utilizando un conjunto de mutaciones de "botón-en-ochal" en el dominio  $C_{H3}$  de Fc. Estas mutaciones conducen a la alteración de la complementariedad del empaquetamiento de residuos entre la interfaz del dominio  $C_{H3}$  dentro del núcleo hidrofóbico conservado estructuralmente, de modo que se favorece la formación del heterodímero en comparación con homodímeros, lo cual logra una buena expresión del heterodímero a partir del cultivo de células de mamífero. Aunque la estrategia condujo a un mayor rendimiento de heterodímeros, los homodímeros no fueron suprimidos por completo (Merchant *et al.*, 1998, *Nat. Biotechnol.* 16(7): 677-81).

Gunasekaran *et al.* exploró la viabilidad de conservar la integridad del núcleo hidrofóbico mientras se impulsa la formación de heterodímero Fc cambiando la complementariedad de carga en la interfaz de dominio  $C_{H3}$  (Gunasekaran *et al.*, 2010, *J. Biol. Chem.* 285(25): 19637-46). Aprovechando el mecanismo de dirección electrostática, estas construcciones mostraron una promoción eficiente de la formación de heterodímeros Fc con una mínima contaminación de homodímeros a través de la mutación de dos pares de residuos cargados situados periféricamente. En contraste con el diseño de botón-en-ochal, los homodímeros fueron suprimidos de manera uniforme debido a la naturaleza del mecanismo de repulsión electrostática, pero no se evitaron totalmente.

Davis *et al.* describen un enfoque de ingeniería de anticuerpos para convertir homodímeros Fc en heterodímeros por interdigitación de segmentos de la cadena  $\beta$  de dominios  $C_{H3}$  de IgG e IgA humanos, sin la introducción de enlaces disulfuro entre cadenas extra (Davis *et al.*, 2010, *Protein Eng. Des. Sel.* 23 (4):195-202). La expresión de proteínas de fusión SEEDbody (Sb) por células de mamífero proporciona heterodímeros Sb con un alto rendimiento que se purifican fácilmente para eliminar subproductos secundarios.

La Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° US 2010/331527 A1 describe un anticuerpo biespecífico basado en la heterodimerización del dominio  $C_{H3}$ , la introducción en una cadena pesada de las mutaciones H95R e Y96F dentro del dominio  $C_{H3}$ . Estas sustituciones de aminoácidos se originan en el dominio  $C_{H3}$  del subtipo IgG3 y se heterodimerizará con una cadena principal de IgG1. Una cadena ligera común propensa a emparejarse con cada una de las cadenas pesadas es un requisito previo para todos los formatos basados en la heterodimerización a través del dominio  $C_{H3}$ . Por lo tanto, se produce un total de tres tipos de anticuerpos: 50% tiene una cadena principal de IgG1 pura, un tercio tiene una cadena principal H95R e Y96F mutada pura, y un tercio tiene dos cadenas pesadas diferentes (bienespecíficas). El heterodímero deseado puede purificarse a partir de esta mezcla, debido a que sus propiedades de unión a Proteína A son diferentes de las de los anticuerpos parentales: los dominios  $C_{H3}$  derivados de IgG3 no se unen a Proteína A, mientras que la IgG1 sí lo hace. En consecuencia, el heterodímero se

une a Proteína A, pero se eluye a un pH más alto que el homodímero de IgG1 pura, y esto hace posible la purificación selectiva del heterodímero biespecífico.

5 La Patente de EE.UU. N° 7.612.181 describe un anticuerpo biespecífico IgG Dual-Dominio Variable (DVD-IgG) que se basa en el formato de Fv Dual descrito en la Patente de EE.UU. N° 5.989.830. Un formato biespecífico similar se describió también en la Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2010/0226923 A1. La adición de dominios constantes a respectivas cadenas de la Fv Dual ( $C_{H1}$ -Fc a la cadena pesada y el dominio constante kappa o lambda de la cadena ligera) dio lugar a anticuerpos biespecíficos funcionales sin necesidad de modificaciones adicionales (es decir, la adición obvia de dominios constantes para mejorar la estabilidad). Algunos de los anticuerpos expresados en el formato DVD-Ig/TBTI muestran un efecto de posición en la segunda posición (o más interna) de unión al antígeno (Fv2). Dependiendo de la secuencia y la naturaleza del antígeno reconocido por la posición Fv2, este dominio de anticuerpo muestra una afinidad reducida a su antígeno (es decir, la pérdida de tasa de enlace en comparación con el anticuerpo parental). Una posible explicación para esta observación es que el enlazador entre  $V_{L1}$  y  $V_{L2}$  sobresale en la región CDR de Fv2, haciendo que Fv2 sea algo inaccesible para los antígenos más grandes.

15 La segunda configuración de un fragmento de anticuerpo biespecífico descrita en la Patente de EE.UU. N° 5.989.830 es la doble cabeza de entrecruzamiento (CODH), que tiene la siguiente orientación de los dominios variables expresadas en dos cadenas:

$V_{L1}$ -enlazador- $V_{L2}$ , para la cadena ligera, y  
 $V_{H2}$ -enlazador- $V_{H1}$ , para la cadena pesada

20 La patente '830 describe que un fragmento de anticuerpo biespecífico de doble cabeza de entrecruzamiento (construcción GOSA.E) conserva una actividad de unión mayor que un Fv Dual (véase la página 20, líneas 20-50 de la patente '830) y describe, además, que este formato se ve menos impactado por los enlazadores que se utilizan entre los dominios variables (véanse las páginas 20-21 de la patente '830). Los documentos EP 2 050 764 y WO 2010/014659 describen formatos de anticuerpos biespecíficos.

## 25 **SUMARIO DE LA INVENCION**

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

En una realización de la invención, una proteína de unión similar a anticuerpo comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno, en donde dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula:

30 
$$V_{L1}-L_1-V_{L2}-L_2-C_L \quad [I]$$

y dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula:

$$V_{H2}-L_3-V_{H1}-L_4-C_{H1}-Fc \quad [II]$$

en donde:

$V_{L1}$  es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

35  $V_{L2}$  es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{H1}$  es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$V_{H2}$  es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$C_L$  es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

$C_{H1}$  es el dominio constante de la cadena pesada  $C_{H1}$  de inmunoglobulina;

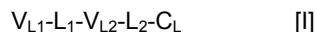
40 Fc es la región de bisagra de inmunoglobulina y  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  son los dominios constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina;

$L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  y  $L_4$  son enlazadores de aminoácidos tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas;

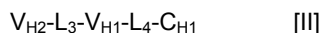
y en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.

La invención también proporciona una proteína de unión similar a anticuerpo que comprende dos cadenas polipeptídicas que forman dos sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula:

5



y una segunda cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula:



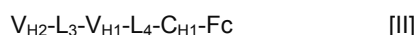
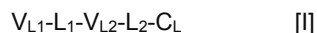
en donde:

- 10  $V_{L1}$  es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;  
 $V_{L2}$  es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;  
 $V_{H1}$  es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;  
 $V_{H2}$  es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;  
 $C_L$  es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;  
15  $C_{H1}$  es el dominio constante de la cadena pesada  $C_{H1}$  de inmunoglobulina;  
 $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  y  $L_4$  son enlazadores de aminoácidos tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas;

y en donde los primero y segundo polipéptidos forman un par de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.

También se describe un método de producir una proteína de unión similar a anticuerpo, que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno, que comprende identificar un primer dominio variable del anticuerpo que se une a un primer antígeno diana y un segundo dominio variable de anticuerpo que une a un segundo antígeno diana, conteniendo cada uno un  $V_L$  y un  $V_H$ ; asignar la cadena ligera o la cadena pesada en forma de una cadena de molde; asignar el  $V_L$  del primer dominio variable del anticuerpo o el segundo dominio variable del anticuerpo como  $V_{L1}$ ; asignar un  $V_{L2}$ , un  $V_{H1}$  y un  $V_{H2}$  de acuerdo con las fórmulas [I] y [II] que figuran a continuación:

20



25

determinar longitudes máxima y mínima para  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  y  $L_4$ ; generar las estructuras de polipéptidos de fórmulas I y II; seleccionar estructuras de polipéptidos de fórmulas I y II que se unen al primer antígeno diana y al segundo antígeno diana cuando se combinan para formar la proteína de unión similar a anticuerpo;

30

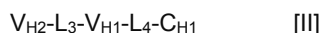
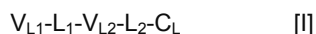
en donde:

- $V_{L1}$  es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;  
 $V_{L2}$  es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;  
 $V_{H1}$  es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;  
 $V_{H2}$  es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;  
35  $C_L$  es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;  
 $C_{H1}$  es el dominio constante de la cadena pesada  $C_{H1}$  de inmunoglobulina;  
 $F_c$  es la región de bisagra de inmunoglobulina y  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  son los dominios constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina; y

$L_1, L_2, L_3$  y  $L_4$  son enlazadores de aminoácidos;

y en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.

5 También se describe un método de producir una proteína de unión similar a anticuerpo, que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno, que comprende identificar un primer dominio variable del anticuerpo que se une a un primer antígeno diana y un segundo dominio variable de anticuerpo que une a un segundo antígeno diana, conteniendo cada uno un  $V_L$  y un  $V_H$ ; asignar la cadena ligera o la cadena pesada en forma de una cadena de molde; asignar el  $V_L$  del primer dominio variable del anticuerpo o el segundo dominio variable del anticuerpo como  $V_{L1}$ ; asignar un  $V_{L2}$ , un  $V_{H1}$  y un  $V_{H2}$  de acuerdo con las fórmulas [I] y [II] que figuran a  
10 continuación:



15 determinar longitudes máxima y mínima para  $L_1, L_2, L_3$  y  $L_4$ ; generar las estructuras de polipéptidos de fórmulas I y II; seleccionar estructuras de polipéptidos de fórmulas I y II que se unen al primer antígeno diana y al segundo antígeno diana cuando se combinan para formar la proteína de unión similar a anticuerpo; en donde:

$V_{L1}$  es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{L2}$  es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{H1}$  es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

20  $V_{H2}$  es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$C_L$  es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

$C_{H1}$  es el dominio constante de la cadena pesada  $C_{H1}$  de inmunoglobulina; y

$L_1, L_2, L_3$  y  $L_4$  son enlazadores de aminoácidos;

25 y en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.

Realizaciones específicas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de ciertas realizaciones y las reivindicaciones.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 **Figura 1.** Representación esquemática de los dominios  $Fv1$  y  $Fv2$  de unión a antígeno dentro de la configuración de la región V dual y disposición de sus respectivos enlazadores peptídicos  $L_L$  y  $L_H$  en el formato TBTI.

**Figura 2.** Diagrama esquemático (2D) de los dominios de unión a antígeno  $Fv1$  (anti-IL4) y  $Fv2$  (anti-IL13) dentro de la configuración dual variable de entrecruzamiento (CODV) y la disposición de sus respectivos enlazadores peptídicos.

35 **Figura 3.** Representación esquemática de  $Fv$  de anti-IL4 y  $Fab$  de anti-IL13 que muestra una posible disposición espacial obtenida por acoplamiento proteína-proteína de  $Fv$  de anti-IL4 y el  $Fv$  de anti-IL13.

**Figura 4.** Evaluación de la capacidad de unión tetravalente y biespecífica de la proteína CODV en un ensayo de BIACORE mediante la inyección de los dos antígenos de forma secuencial o simultánea a través de un chip revestido con proteína DVD-Ig. La señal máxima observada por inyección secuencial se puede obtener por co-inyección de ambos antígenos, lo que demuestra la saturación de todos los sitios de unión.

40 **Figura 5.** Diagrama esquemático (2D) de los dominios de unión a antígeno dentro de la configuración CODV y la disposición de sus respectivos enlazadores peptídicos  $L_L$  ( $L_1$  y  $L_2$ ) y  $L_H$  ( $L_3$  y  $L_4$ ). En el panel A, la cadena ligera se

mantiene en una alineación "lineal o de molde", mientras que la cadena pesada está en la configuración de "entrecruzamiento". En el panel B, la cadena pesada se mantiene en una alineación "lineal o de molde" y la cadena ligera está en la configuración de "entrecruzamiento".

5 **Figura 6.** Representación esquemática del diseño CODV-Ig en función de si la cadena ligera o la cadena pesada se utiliza como "molde".

**Figura 7.** Comparación de moléculas TBTI/DVD-Ig o CODV-Ig que incorporan secuencias de anti-IL13 y anti-IL4.

**Figura 8.** Comparación de formatos CODV-Fab y B-Fab en un ensayo citotóxico utilizando células NALM-6.

## DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

10 La invención proporciona proteínas de unión similares a anticuerpos tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno, en donde cada par de polipéptidos que forman una proteína de unión similar a anticuerpo posee dominios variables duales que tienen una orientación de entrecruzamiento. También se describen métodos para preparar tales proteínas de unión similares a antígeno.

15 El modelado por ordenador predijo que el diseño de entrecruzamiento de doble cabeza (CODH) de la Patente de EE.UU. N° 5.989.830 produciría un complejo en el que los dos sitios de unión miran en la dirección opuesta, sin las restricciones sugeridas para la configuración Dual-Fv de la Patente de EE.UU. N° 7.612.181. En particular, el modelado por ordenador indicó que la longitud de los enlazadores de aminoácidos entre los dominios variables no era crítica para el diseño CODH, pero era importante para permitir el acceso completo a los dos sitios de unión a antígeno en el diseño de Dual Fv. Al igual que con el formato DVD-Ig/TBTI, se prepararon construcciones de  
20 proteínas de unión similares a anticuerpos en las que dominios constantes se fijaron a la configuración CODH para formar proteínas de unión similares a anticuerpos que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos que forman cuatro sitios de unión a antígeno, en donde cada uno de los pares de polipéptidos que forman una proteína de unión similar a anticuerpo posee dominios duales variables que tienen una orientación de entrecruzamiento (es decir, CODH-Ig). Se espera que las moléculas de CODH-Ig posean una estabilidad significativamente mejorada en  
25 comparación con las moléculas de CODH (dado que DVD-Ig/TBTI poseía una estabilidad mejorada frente a moléculas Dual Fv).

Con el fin de probar la hipótesis anterior, se preparó una molécula de CODH-Ig utilizando las secuencias de anticuerpos el anti-IL4 y anti-IL13 descritas en la Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2010/0226923 A1. La molécula de CODH-Ig difería de la molécula de CODH del documento US 2010/0226923 con respecto a las  
30 longitudes de enlazadores de aminoácidos que separan los dominios variables en las respectivas cadenas de polipéptidos. Las moléculas de CODH-Ig se expresaron en células después de la transfección transitoria y se purificaron por cromatografía de Proteína A. Aunque sus perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) mostraron niveles de agregación de 5-10%, ninguna de las moléculas de CODH-Ig era funcional, y por lo tanto ninguna de las moléculas de CODH-Ig era capaz de unirse a todos sus antígenos diana. La falta de actividad de  
35 unión al antígeno puede haber sido debida a una dimerización perturbado de las regiones Fv de las cadenas pesadas y ligeras debido a las inadecuadas longitudes del enlazador comprometiendo la formación correcta del paratopo. Como resultado, se desarrolló un protocolo para identificar enlazadores de aminoácidos adecuados para la inserción entre los dos dominios variables y el segundo dominio variable y el dominio constante tanto en las cadenas polipeptídicas pesada y ligera de una proteína de unión similar a anticuerpo. Este protocolo se basó en el  
40 acoplamiento proteína-proteína de homología y modelos experimentales de las regiones FvIL4 y FvIL13, respectivamente, la inclusión del dominio Fc1 el modelo y la construcción de enlazadores apropiados entre las regiones FvIL4 y FvIL13 y entre las regiones de Fv y Fc1 constantes.

45 Metodologías de ADN recombinante estándares se utilizan para construir los polinucleótidos que codifican los polipéptidos que forman las proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención, incorporan estos polinucleótidos en vectores de expresión recombinantes e introducen dichos vectores en células huésped. Véase, p. ej., Sambrook *et al.*, 2001 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª ed.). Reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante, tal como comúnmente se logra en la técnica, o tal como se describe en esta memoria. A menos que se proporcionan definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los  
50 procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en esta memoria son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. De manera similar, se pueden utilizar técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, suministro y tratamiento de los pacientes.

### 1. Definiciones Generales



Tal como se utiliza de acuerdo con la presente descripción, se entenderá que los siguientes términos y expresiones, a menos que se indique otra cosa, tienen los siguientes significados. A menos que sea requerido por el contexto, los términos en singular incluirán plurales y los términos en plural incluirán el singular.

5 El término "polinucleótido", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a polímeros de ácidos nucleicos de cadena sencilla o de doble cadena de al menos 10 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Tales modificaciones incluyen modificaciones de bases tales como bromuridina, modificaciones de ribosa tales como arabinósido y 2',3'-didesoxirribosa, y modificaciones de enlaces internucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforaniladato y fosforoamidato. El término "polinucleótido" incluye específicamente formas de cadena sencilla y de doble cadena de ADN.

15 Un "polinucleótido aislado" es un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos que, en virtud de su origen, el polinucleótido aislado: (1) no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido en el que el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, (2) está unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

20 Un "polipéptido aislado" es uno que: (1) está libre de al menos algunos otros polipéptidos con los que normalmente se encuentra, (2) está esencialmente libre de otros polipéptidos de la misma fuente, p. ej., de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos aproximadamente 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales con los que está asociado en la naturaleza, (5) no está asociado (por interacción covalente o no covalente) con porciones de un polipéptido con el que el "polipéptido aislado" se asocia en la naturaleza, (6) está asociado operativamente (por interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está asociado en la naturaleza, o (7) no se produce en la naturaleza. Un polipéptido aislado de este tipo puede ser codificado por ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, de origen sintético, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso (terapéutico, de diagnóstico, profiláctico, de investigación o de otro tipo).

30 La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en esta memoria, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden esencialmente a secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanos se producen en mamíferos no humanos, incluyendo, pero no limitados a, roedores tales como ratones y ratas, y lagomorfos tales como conejos. En otras realizaciones, los anticuerpos humanos se producen en células de hibridoma. Aún en otras realizaciones, los anticuerpos humanos se producen de forma recombinante.

35 Anticuerpos que se producen de forma natural comprenden típicamente un tetrámero. Cada uno de tales tetrámeros se compone típicamente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada uno de los pares una cadena "ligera" de longitud completa (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud completa (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las expresiones "cadena pesada" y "cadena ligera", tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tenga suficiente secuencia de dominio variable para conferir especificidad para un antígeno diana. La porción amino-terminal de cada una de las cadenas ligera y pesada incluye típicamente un dominio variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que típicamente es responsable del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada una de las cadenas define típicamente un dominio constante responsable de la función efectora. Así, en un anticuerpo que se produce de forma natural, un polipéptido de inmunoglobulina de cadena pesada de longitud completa incluye un dominio variable ( $V_H$ ) y tres dominios constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ), en el que el dominio  $V_H$  está en el extremo amino del polipéptido y el dominio  $C_{H3}$  está en el extremo carboxilo, y un polipéptido de inmunoglobulina de cadena ligera de longitud completa incluye un dominio variable ( $V_L$ ) y un dominio constante ( $C_L$ ), en donde el dominio  $V_L$  está en el extremo amino del polipéptido y el dominio  $C_L$  está en el extremo carboxilo.

50 Las cadenas ligeras humanas se clasifican típicamente como cadenas ligeras kappa y lambda, y las cadenas pesadas humanas se clasifican típicamente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo tal como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, incluyendo, pero no limitadas a IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases, incluyendo, pero no limitadas a IgM1 e IgM2. IgA se subdivide de manera similar en subclases, incluyendo, pero no limitadas a IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, los dominios variables y constantes están típicamente unidos por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, p. ej., FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul, W., comp., Raven Press, 2ª ed., 1989). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman típicamente un sitio de unión a antígeno. Los dominios variables de anticuerpos que se producen de forma natural exhiben típicamente la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones

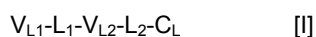
hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDRs. Las CDRs de las dos cadenas de cada uno de los pares están alineadas normalmente por las regiones marco, que pueden permitir la unión a un epítipo específico. Desde el extremo amino al extremo carboxilo, ambos dominios variables de cadena ligera y pesada normalmente comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

5 La expresión "Fc nativa", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una molécula que comprende la secuencia de un fragmento de no unión al antígeno que resulta de la digestión de un anticuerpo o producido por otros medios, ya sea en forma monomérica o multimérica, y puede contener la región de bisagra. La fuente de inmunoglobulina original del Fc nativo es preferiblemente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque se prefieren IgG1 e IgG2. Moléculas de Fc nativo se componen de polipéptidos monoméricos que pueden estar  
10 enlazados en formas diméricas o multiméricas mediante enlaces covalentes (es decir, enlaces disulfuro) y asociación no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativo oscila entre 1 y 4 dependiendo de la clase (p. ej., IgG, IgA e IgE) o subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 e IgA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido por disulfuro resultante de la digestión con papaína de una IgG. La expresión "Fc nativo", tal como se utiliza en esta memoria, es genérica para las formas  
15 monoméricas, diméricas y multiméricas.

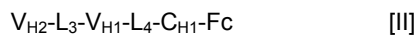
La expresión "variante de Fc", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una molécula o secuencia que se modifica a partir de un Fc nativo, pero que comprende todavía un sitio de unión para el receptor de salvamento, FcRn (receptor Fc neonatal). Variantes Fc a modo de ejemplo, y su interacción con el receptor de salvamento, son conocidas en la técnica. Así, la expresión "variante de Fc" puede comprender una molécula o secuencia que se  
20 humaniza a partir de un Fc nativo no humano. Además de ello, un Fc nativo comprende regiones que pueden separarse porque proporcionan características estructurales o actividad biológica que no son necesarias para las proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención. Así, la expresión "variante de Fc" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos Fc nativos, o en el que uno o más sitios o residuos Fc ha de ser modificado, que afectan o están implicados en: (1) la formación de un enlace disulfuro, (2) la  
25 incompatibilidad con una célula huésped seleccionada, (3) la heterogeneidad N-terminal tras de la expresión en una célula huésped seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con el complemento, (6) la unión a un receptor Fc distinto de un receptor de salvamento o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La expresión "dominio Fc", tal como se utiliza en esta memoria, abarca Fc nativos y variantes de Fc y secuencias tal como se define anteriormente. Al igual que con las variantes de Fc y moléculas de Fc nativas, la expresión "dominio  
30 de Fc" incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, ya sean digeridas a partir del anticuerpo entero o producidos por otros medios.

La expresión "proteína de unión similar a anticuerpo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una molécula que no se produce de forma natural (o recombinante) que se une específicamente a al menos un antígeno diana, y que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión de antígeno, en donde dos cadenas  
35 polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula:



y dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula:



en donde:

40  $V_{L1}$  es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{L2}$  es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{H1}$  es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$V_{H2}$  es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

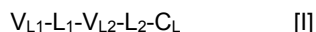
$C_L$  es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

45  $C_{H1}$  es el dominio constante de la cadena pesada  $C_{H1}$  de inmunoglobulina;

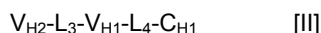
Fc es la región de bisagra de inmunoglobulina y  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  son los dominios constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina;

$L_1, L_2, L_3$  y  $L_4$  son enlazadores de aminoácidos;

5 y en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento. La expresión "proteína de unión similar a anticuerpo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere también a una molécula que se produce de forma no natural (o recombinante) que se une específicamente a al menos un antígeno diana y que comprende dos cadenas polipeptídicas que forman dos sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula:



y una segunda cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula:



10 en donde:

$V_{L1}$  es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{L2}$  es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{H1}$  es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$V_{H2}$  es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

15  $C_L$  es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

$C_{H1}$  es el dominio constante de la cadena pesada  $C_{H1}$  de inmunoglobulina;

$L_1, L_2, L_3$  y  $L_4$  son enlazadores de aminoácidos;

20 y en donde los primero y segundo polipéptidos forman un par de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento. Una molécula "recombinante" es una que ha sido preparada, expresada, creada o aislada por medios recombinantes.

25 Una realización de la invención proporciona proteínas de unión similares a anticuerpos tal como se define en las reivindicaciones adjuntas que tienen especificidad biológica e inmunológica para entre uno y cuatro antígenos diana. Otra realización de la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican cadenas polipeptídicas que forman estas proteínas de unión similares a anticuerpos. Otra realización de la invención proporciona vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico, que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican cadenas polipeptídicas que forman tales proteínas de unión similares a anticuerpos. Aún otra realización de la invención proporciona células huésped que expresan tales proteínas de unión similares a anticuerpos (es decir, que comprenden moléculas o vectores de ácidos nucleicos que codifican cadenas de polipéptidos que forman tales proteínas de unión similares a anticuerpos).

30 La expresión "capacidad de permuta", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la capacidad de intercambio de dominios variables dentro del formato CODV y con retención de plegado y afinidad de unión final. "Capacidad de permuta completa" se refiere a la capacidad de permutar el orden de los dos dominios  $V_{H1}$  y  $V_{H2}$  y, por lo tanto, el orden de los dominios  $V_{L1}$  y  $V_{L2}$ , en un CODV-Ig (es decir, para invertir el orden) o CODV-Fab, al tiempo que se mantiene la plena funcionalidad de la proteína de unión similar a anticuerpo, como se evidencia por la retención de la afinidad de unión. Además, hay que señalar que las designaciones  $V_H$  y  $V_L$  dentro de un CODV-Ig o CODV-Fab particular se refieren sólo a la ubicación del dominio de una cadena de proteína particular en el formato final. Por ejemplo,  $V_{H1}$  y  $V_{H2}$  podrían derivarse de los dominios  $V_{L1}$  y  $V_{L2}$  en los anticuerpos parentales y se colocan en las posiciones  $V_{H1}$  y  $V_{H2}$  en la proteína de unión similar a anticuerpo. Del mismo modo,  $V_{L1}$  y  $V_{L2}$  se podrían derivar de los dominios  $V_{H1}$  y  $V_{H2}$  en los anticuerpos parentales y se colocan en las posiciones  $V_{H1}$  y  $V_{H2}$  en la proteína de unión similar a anticuerpo. Por lo tanto, las designaciones  $V_H$  y  $V_L$  se refieren a la ubicación actual y no a la ubicación original en un anticuerpo parental. Los dominios  $V_H$  y  $V_L$  son, por lo tanto, "permutables".

35 Una proteína de unión similar a anticuerpo "aislada" es una que ha sido identificada y separada y/o recuperada de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para la proteína de unión similar a anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, la proteína de unión similar a anticuerpo se purificará: (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos

de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Proteínas de unión similares a anticuerpos aisladas incluyen la proteína de unión similar a anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural de la proteína de unión similar a anticuerpo no estará presente.

Las expresiones "sustancialmente puro" o "sustancialmente purificado", tal como se utiliza en esta memoria, se refieren a un compuesto o especie que es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En algunas realizaciones, una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie comprende al menos aproximadamente 50% (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En otras realizaciones, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En aún otras realizaciones, la especie se purifica hasta una homogeneidad esencial (especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

El término "antígeno" o la expresión "antígeno diana", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una molécula o una porción de una molécula que es capaz de unirse por una proteína de unión similar a anticuerpo y, además, es capaz de ser utilizada en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno diana puede tener uno o más epítipos. Con respecto a cada uno de los antígenos diana reconocidos por una proteína de unión similar a anticuerpo, la proteína de unión similar a anticuerpo es capaz de competir con un anticuerpo intacto que reconoce el antígeno diana. Una proteína de unión similar a anticuerpo "bivalente", que no sea una proteína de unión similar a anticuerpo "multiespecífica" o "multifuncional", se entiende que comprende sitios de unión a antígeno que tienen especificidad antigénica idéntica.

Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es típicamente un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/cadena ligera diferentes y dos sitios de unión o epítipos diferentes. Anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una diversidad de métodos incluyendo, pero no limitados a la fusión de hibridomas o enlace de fragmentos F(ab').

Un fragmento F(ab) incluye típicamente una cadena ligera y los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H1</sub> de una cadena pesada, en donde la porción V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub> de la cadena pesada del fragmento F(ab) no puede formar un enlace disulfuro con otro polipéptido de cadena pesada. Tal como se utiliza en esta memoria, un fragmento F(ab) también puede incluir una cadena ligera que contiene dos dominios variables separados por un enlazador de aminoácidos y una cadena pesada que contiene dos dominios variables separados por un enlazador de aminoácido y un dominio C<sub>H1</sub>.

Un fragmento F(ab') incluye típicamente una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que contiene más de la región constante (entre los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub>), de manera que se puede formar un enlace disulfuro intercadena entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')<sub>2</sub>.

Las frases "propiedad biológica", "característica biológica" y el término "actividad" en referencia a una proteína de unión similar a anticuerpo de la invención se utilizan de manera indistinta en esta memoria e incluyen, pero no se limitan a, afinidad por y especificidad para el epítipo, la capacidad de antagonizar la actividad de la diana de antígeno (o polipéptido fijado como objetivo), la estabilidad *in vivo* de la proteína de unión similar a anticuerpo y las propiedades inmunogénicas de la proteína de unión similar a anticuerpo. Otras propiedades biológicas identificables o características de una proteína de unión similar a anticuerpo incluyen, por ejemplo, reactividad cruzada, (es decir, con homólogos no humanos de la diana antigénica, o con otras dianas antigénicas o tejidos, generalmente), y capacidad de preservar los altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos. Las propiedades o características mencionadas anteriormente pueden observarse o medirse utilizando técnicas reconocidas en la técnica, incluyendo, pero no limitadas a ELISA, ELISA competitivo, análisis de resonancia de plasmones de superficie, ensayos de neutralización *in vitro* e *in vivo* y la inmunohistoquímica con secciones de tejido de diferentes fuentes, incluyendo seres humanos, primates o cualquier otra fuente según se necesite.

La expresión "fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un fragmento de polipéptido que contiene al menos las CDRs de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulina de las que se deriva el fragmento de polipéptido. Un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional es capaz de unirse a un antígeno diana.

Una proteína de unión similar a anticuerpo "neutralizante", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una molécula que es capaz de bloquear o reducir sustancialmente una función efectora de un antígeno diana al que se une. Tal como se utiliza en esta memoria, "reducir sustancialmente" significa al menos aproximadamente 60%, preferiblemente al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente al menos aproximadamente 75%, incluso

más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, más preferiblemente al menos una reducción de aproximadamente 90% de una función efectora del antígeno diana.

5 El término "epítipo" incluye cualquier determinante, preferiblemente un determinante polipeptídico, capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. En ciertas realizaciones, los determinantes epítipos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo o proteína de unión similar a anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que una proteína de unión similar a anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferencialmente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En realizaciones preferidas, se dice que una proteína de unión similar a anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación de equilibrio es  $\leq 10^{-8}$  M, más preferiblemente cuando la constante de disociación de equilibrio es  $\leq 10^{-9}$  M, y más preferiblemente cuando la constante de disociación es  $\leq 10^{-10}$  M.

15 La constante de disociación ( $K_D$ ) de una proteína de unión similar a anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, mediante resonancia de plasmones de superficie. En general, el análisis de resonancia de plasmones de superficie mide en tiempo real las interacciones entre la unión del ligando (un antígeno diana en una matriz de biosensor) y analito (una proteína de unión similar a anticuerpo en disolución) mediante resonancia de plasmones de superficie (SPR) utilizando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ). El análisis de plasmones de superficie también se puede realizar mediante la inmovilización del analito (proteína de unión similar a anticuerpo en una matriz de biosensor) y la presentación del ligando (antígeno diana). El término " $K_D$ ", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la constante de disociación de la interacción entre una proteína de unión similar a anticuerpo particular y un antígeno diana.

25 La expresión "se une específicamente", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la capacidad de una proteína similar a anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de unirse a un antígeno que contiene un epítipo con una  $K_D$  de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M,  $1 \times 10^{-12}$  M, o más, y/o para unirse a un epítipo con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico.

30 El término "enlazador", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a uno o más residuos aminoácidos insertados entre dominios de inmunoglobulina para proporcionar suficiente movilidad para los dominios de las cadenas ligeras y pesadas para doblar en cruz inmunoglobulinas de región variable duales. Un enlazador se inserta en la transición entre los dominios variables o entre los dominios variables y constantes, respectivamente, a nivel de secuencia. La transición entre dominios puede ser identificada, debido a que el tamaño aproximado de los dominios de inmunoglobulina se conoce bien. La ubicación exacta de una transición de dominio se puede determinar mediante la localización de tramos de péptidos que no forman elementos estructurales secundarios tales como láminas beta o hélices alfa tal como se demuestra por los datos experimentales o como puede ser asumido por técnicas de modelado o de predicción de estructura secundaria. Los enlazadores descritos en esta memoria se denominan  $L_1$ , que se encuentra en la cadena ligera entre los dominios  $V_{L1}$  y  $V_{L2}$  N-terminales;  $L_2$ , que también está en la cadena ligera, se encuentra entre los dominios  $V_{L2}$  y  $C_L$  C-terminal. Los enlazadores de cadena pesada se conocen como  $L_3$ , que se encuentra entre los dominios  $V_{H2}$  y  $V_{H1}$  N-terminales; y  $L_4$ , que se encuentra entre los dominios  $V_{H1}$  y  $C_{H1}$ -Fc. Los enlazadores  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  y  $L_4$  son independientes, pero pueden, en algunos casos, tener la misma secuencia y/o longitud.

45 El término "vector", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier molécula (p. ej., ácido nucleico, plásmido, o virus) que se utiliza para transferir información de codificación a una célula huésped. El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico que es capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a una molécula de ADN de doble cadena circular, en la que pueden insertarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales se pueden insertar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (p. ej., vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped y, con ello, se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están enlazados operativamente. Tales vectores se denominan en esta memoria "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" pueden utilizarse indistintamente en esta memoria, dado que un plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p. ej., retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que sirven para funciones equivalentes.

La expresión "enlazado operativamente" se utiliza en esta memoria para referirse a una disposición de secuencias flanqueantes en la que las secuencias flanqueantes así descritas se configuran o ensamblan con el fin de realizar su función habitual. Por lo tanto, una secuencia flanqueante unida operativamente a una secuencia codificante puede ser capaz de efectuar la replicación, transcripción y/o traducción de la secuencia codificante. Por ejemplo, una

5 secuencia codificante está unida operativamente a un promotor cuando el promotor es capaz de dirigir la transcripción de esa secuencia de codificación. Una secuencia flanqueante no necesita ser contigua a la secuencia codificante, siempre que funcione correctamente. Así, por ejemplo, secuencias intermedias, no traducidas aunque transcritas, pueden estar presentes entre una secuencia de promotor y la secuencia codificante y la secuencia promotora todavía puede considerarse "operativamente unida" a la secuencia codificante.

10 La frase "célula huésped recombinante" (o "célula huésped"), tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Una célula huésped o una célula huésped recombinante pretende referirse no sólo a la célula objeto particular, sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero este tipo de células todavía

15 están incluidas dentro del alcance de la expresión "célula huésped" tal como se utiliza en esta memoria. Una amplia variedad de sistemas de expresión de célula huésped se puede utilizar para expresar las proteínas de unión similares a anticuerpo de la invención, incluyendo sistemas de expresión en bacterias, levaduras, baculovirus y mamíferos (así como los sistemas de expresión de presentación de fagos). Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUC19. Para expresar una proteína de unión similar a anticuerpo de forma recombinante, una célula huésped se transforma o transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan

20 fragmentos de ADN que codifican las cadenas de polipéptidos de la proteína de unión similar a anticuerpo, de manera que las cadenas polipeptídicas se expresan en la célula huésped y, preferiblemente, se secretan en el medio en el que se cultivan las células huésped, medio del cual se puede recuperar la proteína de unión similar a anticuerpo.

25 El término "transformación" tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula ha sido transformada cuando ha sido modificada para contener un nuevo ADN. Por ejemplo, una célula se transforma cuando se modifica genéticamente a partir de su estado nativo. Después de la transformación, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula mediante la integración física en un cromosoma de la célula, o puede ser mantenido transitoriamente como un elemento episomal sin ser replicado, o

30 puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula que ha sido transformada de forma estable cuando el ADN se replica con la división de la célula. El término "transfección", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la captación de ADN extraño o exógeno por parte de una célula, y una célula ha sido "transfectada" cuando el ADN exógeno ha sido introducido dentro de la membrana celular. Un cierto número de técnicas de transfección son bien conocidas en la técnica. Tales técnicas se pueden utilizar para introducir una o

35 más moléculas de ADN exógeno en células huésped adecuadas.

La expresión "que se produce de forma natural", tal como se utiliza en esta memoria y se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que el objeto puede encontrarse en la naturaleza y no ha sido manipulado por el hombre. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionadamente por el hombre es que se produce

40 de forma natural. Del mismo modo, " que no se produce de forma natural", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un objeto que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido modificado estructuralmente o sintetizado por el hombre.

Tal como se utiliza en esta memoria, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Estereoisómeros (p. ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales; aminoácidos no naturales tales como aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos, N-alquil- aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no

45 convencionales también pueden ser componentes adecuados para las cadenas polipeptídicas de proteínas de unión similares a anticuerpo de la invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxi prolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato,  $\epsilon$ -N,N,N-trimetilisina,  $\epsilon$ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmietionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisilina,  $\sigma$ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (p. ej., 4-hidroxi prolina).

50 En la notación de polipéptidos utilizada en esta memoria, la dirección de la izquierda es la dirección amino-terminal y la dirección de la derecha es la dirección carboxi-terminal, de acuerdo con el uso y la convención estándares.

Residuos que se producen de forma natural pueden dividirse en clases basadas en propiedades de cadena lateral común:

- 55 (1) hidrofóbicos: Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Pro;  
 (2) hidrofílicos polares: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr;  
 (3) alifáticos: Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Pro;  
 (4) hidrofóbicos alifáticos: Ala, Ile, Leu, Val, Pro;  
 (5) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

- (6) de carácter ácido: Asp, Glu;
- (7) de carácter básico: His, Lys, Arg;
- (8) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (9) aromáticos: His, Trp, Tyr, Phe; y
- (10) hidrofóbicos aromáticos: Phe, Trp, Tyr.

5 Sustituciones de aminoácidos conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases con otro miembro de la misma clase. Sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden abarcar residuos aminoácidos que no se producen de forma natural, que se incorporan típicamente mediante síntesis peptídica química en lugar de mediante síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de restos de aminoácidos. Las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

15 Un experto en la técnica será capaz de determinar variantes adecuadas de las cadenas polipeptídicas de las proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención utilizando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un experto en la técnica puede identificar zonas adecuadas de una cadena polipeptídica que se pueden cambiar sin destruir la actividad, fijando como objetivo regiones que no se cree que sean importantes para la actividad. Alternativamente, un experto en la técnica puede identificar residuos y porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. Además, incluso zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden ser objeto de sustituciones conservativas de aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente la estructura del polipéptido.

20 El término "paciente", tal como se utiliza en esta memoria, incluye sujetos humanos y animales.

Un "trastorno" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento utilizando las proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención. "Trastorno" y "afección" se utilizan indistintamente en esta memoria e incluyen trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen a un paciente al trastorno en cuestión.

25 Los términos "tratamiento" o "tratar", tal como se utilizan en esta memoria, se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que están en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que tienen el trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que el trastorno debe prevenirse.

30 Las expresiones "composición farmacéutica" o "composición terapéutica", tal como se utiliza en esta memoria, se refieren a un compuesto o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente.

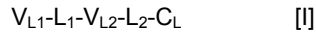
La expresión "soporte farmacéuticamente aceptable" o "soporte fisiológicamente aceptable" tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a uno o más materiales de formulación adecuados para llevar a cabo o mejorar la administración de una proteína de unión similar a anticuerpo.

35 Las expresiones "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz", cuando se utilizan en referencia a una composición farmacéutica que comprende una o más proteínas de unión a anticuerpos se refieren a una cantidad o dosis suficiente para producir un resultado terapéutico deseado. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de una proteína de unión similar a anticuerpo suficiente para inhibir, durante algún periodo de tiempo, uno o más de los procesos patológicos clínicamente definidos asociados con la afección a tratar. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de la proteína de unión similar a anticuerpo específico que se utiliza, y también depende de una diversidad de factores y condiciones relacionadas con el paciente a tratar y la gravedad del trastorno. Por ejemplo, si la proteína de unión similar a anticuerpo se ha de administrar *in vivo*, factores tales como la edad, el peso y la salud del paciente, así como las curvas de dosis-respuesta y los datos de toxicidad obtenidos en el trabajo preclínico con animales estaría entre esos factores considerados. La determinación de una cantidad eficaz o cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica dada está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

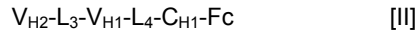
Una realización de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión similar a anticuerpo tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

50 **2. Proteínas de unión similares a anticuerpos**

En una realización de la invención, las proteínas de unión similares a anticuerpos comprenden cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno en donde dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula:



5 y dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula:



en donde

$V_{L1}$  es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{L2}$  es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

10  $V_{H1}$  es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$V_{H2}$  es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$C_L$  es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

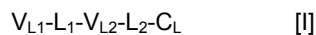
$C_{H1}$  es el dominio constante de la cadena pesada  $C_{H1}$  de inmunoglobulina;

15  $Fc$  es la región de bisagra de inmunoglobulina y  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  son los dominios constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina;

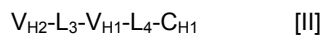
$L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  y  $L_4$  son enlazadores de aminoácidos tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas;

y en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman una pareja de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.

20 En otra realización de la invención, las proteínas de unión similares a anticuerpos comprenden dos cadenas polipeptídicas que forman dos sitios de unión a antígeno en donde una primera cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula:



y una segunda cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula:



25 en donde

$V_{L1}$  es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{L2}$  es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{H1}$  es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$V_{H2}$  es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

30  $C_L$  es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

$C_{H1}$  es el dominio constante de la cadena pesada  $C_{H1}$  de inmunoglobulina;

$L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  y  $L_4$  son enlazadores de aminoácidos tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas;

y en donde los primer y segundo polipéptidos forman una pareja de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.



Las proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención se pueden preparar utilizando los dominios o secuencias obtenidos o derivados de cualquier anticuerpo humano o no humano, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos humanos, murinos o humanizados.

5 En algunos anticuerpos como proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención, la longitud de  $L_3$  es al menos el doble de la longitud de  $L_1$ . En otro anticuerpo, como proteínas de de unión similares a anticuerpos de la invención, la longitud de  $L_4$  es al menos dos veces la longitud de  $L_2$ . En algunas proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención, la longitud de  $L_1$  es al menos el doble de la longitud de  $L_3$ . En otras proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención de unión, la longitud de  $L_2$  es al menos dos veces la longitud de  $L_4$ .

10 En algunas proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención,  $L_1$  es de 3 a 12 residuos aminoácidos de longitud,  $L_2$  es de 3 a 14 residuos aminoácidos de longitud,  $L_3$  es de 1 a 8 residuos aminoácidos de longitud y  $L_4$  es de 1 a 3 residuos aminoácidos de longitud. En otras proteínas de unión similares a anticuerpos,  $L_1$  es de 5 a 10 residuos aminoácidos de longitud,  $L_2$  es de 5 a 8 residuos aminoácidos de longitud,  $L_3$  es de 1 a 5 residuos aminoácidos de longitud y  $L_4$  es de 1 a 2 residuos aminoácidos de longitud. En una proteína de unión similar a anticuerpo preferida,  $L_1$  es de 7 residuos aminoácidos de longitud,  $L_2$  es de 5 residuos aminoácidos de longitud,  $L_3$  es de 1 residuo aminoácido de longitud y  $L_4$  es de 2 residuos aminoácidos de longitud.

20 En algunas proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención,  $L_1$  es de 1 a 3 residuos aminoácidos de longitud,  $L_2$  es de 1 a 4 residuos aminoácidos de longitud,  $L_3$  es de 2 a 15 residuos aminoácidos de longitud y  $L_4$  es de 2 a 15 residuos aminoácidos de longitud. En otras proteínas de unión similares a anticuerpos,  $L_1$  es de 1 a 2 residuos aminoácidos de longitud,  $L_2$  es de 1 a 2 residuos aminoácidos de longitud,  $L_3$  es de 4 a 12 residuos aminoácidos de longitud y  $L_4$  es de 2 a 12 residuos aminoácidos de longitud. En una proteína de unión similar a anticuerpo preferida,  $L_1$  es de 1 residuo aminoácido de longitud,  $L_2$  es de 2 residuos aminoácidos de longitud,  $L_3$  es de 7 residuos aminoácidos de longitud y  $L_4$  es de 5 residuos aminoácidos de longitud.

25 También se describen en esta memoria proteínas de unión similares a anticuerpos, en las que  $L_1$ ,  $L_3$  o  $L_4$  pueden ser iguales a cero. Sin embargo, en proteínas de unión similares a anticuerpos, en donde  $L_1$ ,  $L_3$  o  $L_4$  es igual a cero, el enlazador de transición correspondiente entre la región variable y la región constante o entre los dominios variables duales en la otra cadena pueden no ser cero. En algunas realizaciones,  $L_1$  es igual a cero y  $L_3$  es 2 o más residuos aminoácidos,  $L_3$  es igual a cero y  $L_1$  es igual a 1 o más residuos aminoácidos, o  $L_4$  es igual a 0 y  $L_2$  es de 3 o más residuos aminoácidos.

30 En algunas proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención, al menos uno de los enlazadores seleccionados del grupo que consiste en  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  y  $L_4$  contienen al menos un residuo cisteína.

35 Ejemplos de enlazadores adecuados incluyen un solo residuo glicina (Gly); un péptido diglicina (Gly-Gly); un tripéptido (Gly-Gly-Gly); un péptido con cuatro residuos glicina (Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 25); un péptido con cinco residuos glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 26); un péptido con seis residuos glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 27); un péptido con siete residuos glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 28); un péptido con ocho residuos glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 29). Se pueden utilizar otras combinaciones de residuos aminoácidos tal como el péptido Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 30) y el péptido Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 31). Otros enlazadores adecuados incluyen un solo residuo Ser y Val; el dipéptido Arg-Thr, Gln-Pro, Ser-Ser, Thr-Lys y Ser-Leu; Thr-Lys-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO: 52), Thr-Val-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 53), Gln-Pro-Lys-Ala-Ala (SEQ ID NO: 54), Gln-Arg-Ile-Glu-Gly (SEQ ID NO: 55); Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO: 48), Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser (SEQ ID NO: 49), Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 50) y His-Ile-Asp-Ser-Pro-Asn-Lys (SEQ ID NO: 51). Los ejemplos enumerados anteriormente no están destinados a limitar el alcance de la invención de modo alguno, y enlazadores que comprenden los aminoácidos seleccionados al azar, seleccionados de entre el grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, glicina y prolina han demostrado ser adecuados en las proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención (véase el Ejemplo 12).

45 La identidad y la secuencia de residuos aminoácidos en el enlazador pueden variar en función del tipo de elemento estructural secundario necesario para alcanzar en el enlazador. Por ejemplo, glicina, serina y alanina son los mejores para enlazadores que tienen la máxima flexibilidad. Una cierta combinación de glicina, prolina, treonina y serina es útil si es necesario un enlazador más rígido y extendido. Cualquier residuo aminoácido puede ser considerado como un enlazador en combinación con otros residuos aminoácidos para la construcción de enlazadores péptidicos más grandes según sea necesario dependiendo de las propiedades deseadas.

50 En algunas proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención,  $V_{L1}$  comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;  $V_{L2}$  comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;  $V_{H1}$  comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y  $V_{H2}$  comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En algunas realizaciones de la invención, la proteína de unión similar a anticuerpo es capaz de unirse específicamente a una o más dianas antigénicas. En realizaciones preferidas de la invención, la proteína de unión similar a anticuerpo es capaz de unirse específicamente a al menos una diana de antígeno seleccionada del grupo que consiste en B7.1, B7.2, BAFF, BlyS, C3, C5, CCL11 (eotaxina), CCL15 (MIP-1d), CCL17 (TARC), CCL19 (MIP-3b), CCL2 (MCP-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), SLC, CCL24 (MPL-2/eotaxina-2), CCL25 (TECK), CCL26 (eotaxina-3), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CD3, CD19, CD20, CD24, CD40, CD40L, CD80, CD86, CDH1 (E-cadherina), quitinasa, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), CTLA4, CX3CL1 (SCYD1), CXCL12 (SDF1), CXCL13, EGFR, FCER1A, FCER2, HER2, IGF1R, IL-1, IL-12, IL13, IL415, IL17, IL18, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1β, IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL9, IL12/23, IL22, IL23, IL25, IL27, IL35, ITGB4 (b 4 integrina), LEP (leptina), MHC de clase II, TLR2, TLR4, TLR5, TNF, TNF-a, TNFSF4 (ligando OX40), TNFSF5 (ligando CD40), receptores de tipo Toll, TREM1, TSLP, TWEAK, XCR1 (GPR5/CCXCR1), DNNGR-1 (CLEC91) y HMGB1. En otras realizaciones de la invención, la proteína de unión similar a anticuerpo es capaz de inhibir la función de una o más de las dianas de antígeno.

En algunas realizaciones de la invención, la proteína de unión similar a anticuerpo biespecífica es capaz de unir dos dianas o epítopos de antígenos diferentes. En una realización preferida de la invención, la proteína de unión similar a anticuerpo es biespecífica y cada par de cadena pesada-cadena ligera es capaz de unir dos dianas o epítopos antigénicos diferentes. En una realización más preferida, la proteína de unión similar a anticuerpo es capaz de unir dos dianas de antígenos diferentes que se seleccionan del grupo que consiste en IL4 e IL13, IGF1R y HER2, IGF1R y EGFR, EGFR y HER2, BK e IL13, PDL-1 y CTLA-4, CTLA4 y MHC clase II, IL-12 e IL-18, IL-1α e IL-1β, TNF e IL12/23, TNF e IL-12p40, TNFα e IL-1β, TNFα e IL- 23, e IL17 e IL23. En una realización incluso más preferida, la proteína de unión a anticuerpo es capaz de unir las dianas de antígeno IL-4 e IL13.

En algunas realizaciones de la invención, la proteína de unión similar a anticuerpo se une específicamente a IL-4 con una tasa de enlace de  $2.97 \times 10^7$  y una tasa de desenlace de  $3,30 \times 10^{-4}$ , y se une específicamente a IL-13 con una tasa de enlace de  $1,39 \times 10^6$  y una tasa de desenlace de  $1,63 \times 10^{-4}$ . En otras realizaciones de la invención, la proteína de unión a anticuerpo se une específicamente a IL-4 con una tasa de enlace de  $3,16 \times 10^7$  y una tasa de desenlace de  $2,89 \times 10^{-4}$  y se une específicamente a IL-13 con una tasa de enlace de  $1,20 \times 10^6$  y una tasa de desenlace de  $1,12 \times 10^{-4}$ .

También se describe un método, en el que una proteína de unión similar a anticuerpo, que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno, se prepara identificando un primer dominio variable del anticuerpo que se une a un primer antígeno diana y un segundo dominio variable del anticuerpo que se une a un segundo antígeno diana, conteniendo cada uno un  $V_L$  y un  $V_H$ ; asignando la cadena ligera o la cadena pesada en forma de una cadena de molde; asignando el  $V_L$  del primer dominio variable del anticuerpo o el segundo dominio variable del anticuerpo como  $V_{L1}$ ; asignando un  $V_{L2}$ , un  $V_{H1}$  y un  $V_{H2}$  de acuerdo con las fórmulas [I] y [II] que figuran a continuación:



determinando longitudes máxima y mínima para  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  y  $L_4$ ; generando las estructuras de polipéptidos de fórmulas I y II; seleccionando estructuras de polipéptidos de fórmulas I y II que se unen al primer antígeno diana y al segundo antígeno diana cuando se combinan para formar la proteína de unión similar a anticuerpo;

40 en donde:

$V_{L1}$  es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{L2}$  es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{H1}$  es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$V_{H2}$  es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

45  $C_L$  es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

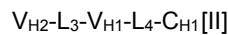
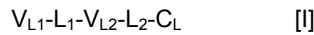
$C_{H1}$  es el dominio constante de la cadena pesada  $C_{H1}$  de inmunoglobulina;

$F_c$  es la región de bisagra de inmunoglobulina y  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  son los dominios constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina;

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> son enlazadores de aminoácidos;

y en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman una pareja de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.

5 También se describe un método, en el que una proteína de unión similar a anticuerpo, que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno, se prepara identificando un primer dominio variable del anticuerpo que se une a un primer antígeno diana y un segundo dominio variable del anticuerpo que se une a un segundo antígeno diana, conteniendo cada uno un V<sub>L</sub> y un V<sub>H</sub>; asignando la cadena ligera o la cadena pesada en forma de una cadena de molde; asignando el V<sub>L</sub> del primer dominio variable del anticuerpo o el segundo dominio variable del anticuerpo como V<sub>L1</sub>; asignando un V<sub>L2</sub>, un V<sub>H1</sub> y un V<sub>H2</sub> de acuerdo con las fórmulas [I] y [II] que figuran a continuación:



15 determinando longitudes máxima y mínima para L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub>; generando las estructuras de polipéptidos de fórmulas I y II; seleccionando estructuras de polipéptidos de fórmulas I y II que se unen al primer antígeno diana y al segundo antígeno diana cuando se combinan para formar la proteína de unión similar a anticuerpo;

en donde:

V<sub>L1</sub> es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V<sub>L2</sub> es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V<sub>H1</sub> es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

20 V<sub>H2</sub> es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

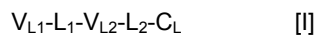
C<sub>L</sub> es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

C<sub>H1</sub> es el dominio constante de la cadena pesada C<sub>H1</sub> de inmunoglobulina; y

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> son enlazadores de aminoácidos;

25 y en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman una pareja de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.

También se describe un método para producir una proteína de unión similar a anticuerpo, que comprende expresar en una célula una o más moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos que tienen estructuras representadas por las fórmulas [I] y [II] que figuran a continuación:



30 
$$V_{H2}-L_3-V_{H1}-L_4-C_{H1}-F_C \quad [II]$$

en donde:

V<sub>L1</sub> es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V<sub>L2</sub> es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V<sub>H1</sub> es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

35 V<sub>H2</sub> es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C<sub>L</sub> es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

C<sub>H1</sub> es el dominio constante de la cadena pesada C<sub>H1</sub> de inmunoglobulina;

Fc es la región de bisagra de inmunoglobulina y C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> son los dominios constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina;

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> son enlazadores de aminoácidos;

5 y en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman una pareja de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.

También se describe un método para producir una proteína de unión similar a anticuerpo, que comprende expresar en una célula una o más moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos que tienen estructuras representadas por las fórmulas [I] y [II] que figuran a continuación:



en donde:

V<sub>L1</sub> es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V<sub>L2</sub> es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V<sub>H1</sub> es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

15 V<sub>H2</sub> es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C<sub>L</sub> es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

C<sub>H1</sub> es el dominio constante de la cadena pesada C<sub>H1</sub> de inmunoglobulina; y

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> son enlazadores de aminoácidos;

20 y en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman una pareja de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.

### 3. Usos de las proteínas de unión similares a anticuerpos

25 Las proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención se pueden emplear en cualquier procedimiento de ensayo conocido tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación para la detección y cuantificación de uno o más antígenos diana. Las proteínas de unión similares a anticuerpos se unirán al uno o más antígenos diana con una afinidad que es apropiada para emplear el método de ensayo.

30 Para aplicaciones de diagnóstico, en ciertas realizaciones, las proteínas de unión similares a anticuerpos se pueden marcar con un resto detectable. El resto detectable puede ser uno cualquiera que sea capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo tal como <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, o <sup>67</sup>Ga; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima tal como fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante.

35 Las proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención también son útiles para la formación *in vivo* de imágenes. Una proteína de unión similar a anticuerpo marcada con un resto detectable se puede administrar a un animal, preferiblemente en el torrente sanguíneo, y se ensaya la presencia y localización del anticuerpo marcado en el huésped. La proteína de unión similar a anticuerpo puede marcarse con cualquier resto que sea detectable en un animal, ya sea por resonancia magnética nuclear, radiología u otro medio de detección conocido en la técnica.

40 También se describe un kit que comprende una proteína de unión similar a anticuerpo y otros reactivos útiles para detectar niveles de antígeno diana en muestras biológicas. Estos reactivos pueden incluir un marcador detectable, suero de bloqueo, muestras de control positivas y negativas y reactivos de detección.

### 4. Composiciones Terapéuticas de Proteínas de Unión Similares a Anticuerpos y administración de las mismas

Composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden proteínas de unión similares a anticuerpos tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas están dentro del alcance de la invención. Tales composiciones terapéuticas o farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión similar a anticuerpo, o conjugado de proteína-fármaco de unión similar a anticuerpo, en mezcla con un agente de formulación farmacéutica o fisiológicamente aceptable seleccionado para la idoneidad con el modo de administración.

Materiales de formulación aceptables son preferiblemente no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas.

La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, viscosidad, claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, la adsorción o la penetración de la composición. Materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina), antimicrobianos, antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito sódico o hidrógeno-sulfito de sodio), tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos), agentes conferidores de consistencia (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)), agentes formadores de complejos (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina), cargas, monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa, o dextrinas), proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas), colorantes, aromatizantes y agentes diluyentes, agentes emulsionantes, polímeros hidrofílicos (tales como polivinilpirrolidona), polipéptidos de bajo peso molecular, iones conjugados formadores de sales (tales como sodio), conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno), disolventes (tales como glicerol, propilenglicol o polietilenglicol), azúcar-alcoholes (tales como manitol o sorbitol), agentes de suspensión, tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics; PEG; ésteres de sorbitán; polisorbatos tales como polisorbato 20 o polisorbato 80; tritón; trometamina; lecitina; colesterol o tiloxapal), agentes mejoradores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol), agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos - preferiblemente cloruro de sodio o potasio - o manitol sorbitol), vehículos de administración, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos (véase, p. ej., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (18ª ed., A.R. Gennaro, comp., Mack Publishing Company 1990), y ediciones posteriores del mismo).

La composición farmacéutica óptima será determinada por un experto en la técnica dependiendo, por ejemplo, de la ruta de administración pretendida, el formato de suministro y la dosis deseada. Tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y la tasa de aclaramiento *in vivo* de la proteína de unión similar a anticuerpo.

El vehículo o soporte primario en una composición farmacéutica puede ser acuoso o no acuoso por naturaleza. Por ejemplo, un vehículo o soporte adecuado para inyección puede ser agua, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para la administración parenteral. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos a modo de ejemplo adicionales. Otras composiciones farmacéuticas a modo de ejemplo comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que puede incluir además sorbitol o un sustituto adecuado. Composiciones de proteínas de unión similares a anticuerpos se pueden preparar para el almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales en forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Además, la proteína de unión similar a anticuerpo puede formularse como un liofilizado utilizando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden seleccionar para la administración parenteral. Alternativamente, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para el suministro a través del tracto digestivo tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la experiencia de la técnica.

Los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. Por ejemplo, se utilizan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas pueden estar en forma de una disolución apirógena, parenteralmente aceptable, acuosa que comprende la proteína de unión similar a anticuerpo deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que una proteína de unión a anticuerpo se formula como una disolución estéril, isotónica, apropiadamente preservada. Aún otra preparación puede implicar la formulación de la molécula

deseada con un agente tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que proporciona la liberación controlada o sostenida del producto que puede ser suministrado a través de una inyección de depósito. También se puede utilizar ácido hialurónico, y esto puede tener el efecto de fomentar la duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de administración de fármacos implantables.

En una realización, una composición farmacéutica se puede formular para inhalación. Por ejemplo, una proteína de unión similar a anticuerpo se puede formular como un polvo seco para inhalación. Disoluciones de inhalación de proteína de unión similares a anticuerpos también se pueden formular con un propulsor para la administración en aerosol. Aún en otra realización, las disoluciones se pueden nebulizar.

También se contempla que ciertas formulaciones se puedan administrar por vía oral. Proteínas de unión similares a anticuerpos que se administran de esta manera se pueden formular con o sin los soportes habitualmente utilizados en la composición de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula puede diseñarse para liberar la porción activa de la formulación en el punto en el tracto gastrointestinal cuando la biodisponibilidad es maximizada y la degradación pre-sistémica se minimiza. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de la proteína de unión similar a anticuerpo. Pueden emplearse también diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes.

Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de proteínas de unión similares a anticuerpo en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Disolviendo los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, las disoluciones se pueden preparar en forma de dosis unitaria. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a diluyentes inertes tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o agentes de unión tales como almidón, gelatina o acacia; o agentes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco lubricante.

Composiciones farmacéuticas adicionales resultarán evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican proteínas de unión similares a anticuerpos en formulaciones de suministro sostenida o controlada. Las técnicas para formular una diversidad de otros medios de suministro sostenido o controlado tales como soportes de liposomas, micropartículas bio-erosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito, también son conocidas por los expertos en la técnica. Ejemplos adicionales de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, poli(2-hidroxietilmetacrilato), etileno-acetato de vinilo o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que se pueden preparar por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de la invención a utilizar para la administración *in vivo* típicamente deben ser estériles. Esto se puede lograr mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En los casos en los que la composición se liofiliza, la esterilización utilizando este método puede llevarse a cabo ya sea antes de, o después de la liofilización y reconstitución. La composición para administración parenteral se puede almacenar en forma liofilizada o en una disolución. Además, las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene una lumbra de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, se puede almacenar en viales estériles en forma de una disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido, o como un polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones se pueden almacenar ya sea en una forma lista para usar o en una forma (p. ej., liofilizada) que requiere la reconstitución antes de la administración.

También se describen kits para producir una unidad de administración de dosis única. Cada uno de los kits puede contener tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. También se describen kits que contienen jeringas precargadas de una y múltiples cámaras (p. ej., jeringas de líquido y liso-jeringas).

La cantidad eficaz de una composición farmacéutica de proteína de unión similar a anticuerpo a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán, por lo tanto, dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, de la indicación para la que se utiliza la proteína de unión similar a anticuerpo, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y condición (edad y salud general) del paciente. De acuerdo con ello, el médico puede titular la dosificación y modificar la vía de administración

5 para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede oscilar entre aproximadamente 0,1 µg/kg y hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación puede variar desde 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 5 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 35 µg/kg, 40 µg/kg, 45 µg/kg, 50 µg/kg, 55 µg/kg, 60 µg/kg, 65 µg/kg, 70 µg/kg, 75 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg.

10 La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de unión similar a anticuerpo en la formulación que se esté utilizando. Típicamente, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosis que consiga el efecto deseado. Por lo tanto, la composición puede administrarse como una dosis única, como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o catéter. El refinamiento adicional de la dosificación apropiada se realiza rutinariamente por los expertos ordinarios en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas realizadas rutinariamente por ellos. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse a través del uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

15 La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con métodos conocidos, p. ej., por vía oral; a través de inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; por sistemas de liberación sostenida; o mediante dispositivos de implantación. En los casos en los que se desee, las composiciones se pueden administrar por inyección de bolo o continuamente mediante infusión, o mediante un dispositivo de implantación.

20 La composición también se puede administrar localmente a través de implantación de una membrana, esponja, u otro material apropiado sobre el que la molécula deseada se ha absorbido o encapsulado. En los casos en los que se utilice un dispositivo de implantación, el dispositivo puede ser implantado en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro de la molécula deseada puede ser mediante difusión, bolo de liberación en el tiempo o una administración continua.

## 5. Ejemplos

25 Los Ejemplos que siguen son ilustrativos de realizaciones específicas de la invención, y diversos usos de los mismos. Se recogen únicamente con fines explicativos, y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de modo alguno.

### Ejemplo 1. Diseño y Modificación por Ingeniería de Proteínas de Unión similares a Anticuerpo de la Región Variable Dual de Entrecruzamiento Biespecíficos

30 La región variable dual de entrecruzamiento en un formato Fv fue descrita en la Patente de EE.UU. N° 5,989,830 y fue aludida como una configuración de doble cabeza de entrecruzamiento (CODH). El modelado molecular predijo que los resultados del diseño de doble cabeza de entrecruzamiento (CODH) en un complejo con los dos sitios de unión que miran en direcciones opuestas, sin las restricciones sugeridas para la configuración de Fv Dual. El formato CODH Fv se examinó para determinar si se podría convertir en moléculas similares a anticuerpos completas por  
 35 adición de un dominio C<sub>L</sub> en la cadena ligera y una región Fc en la cadena pesada. Una conversión similar fue un éxito para los correspondientes dominios variables duales (DVD-Ig) y TBTI tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 7.612.181 y la Publicación Internacional N° WO 2009/052081. La disposición de las regiones variables en el formato CODH se muestra en las estructuras que figuran a continuación, que indican la orientación de amino a carboxilo de las cadenas peptídicas:

40 (a) cadena ligera: NH<sub>2</sub>-V<sub>L1</sub>-Enlazador-V<sub>L2</sub>-COOH  
 (b) cadena pesada: NH<sub>2</sub>-V<sub>H2</sub>-Enlazador-V<sub>H1</sub>-COOH

La disposición amino a carboxilo-terminal de las regiones variables en (a) y (b) anteriores se pueden distinguir de la disposición en la configuración de Fv-Dual mostrada en (c) y (d) que figuran a continuación:

45 (c) cadena ligera: NH<sub>2</sub>-V<sub>L1</sub>-Enlazador-V<sub>L2</sub>-COOH  
 (d) cadena pesada: NH<sub>2</sub>-V<sub>H1</sub>-Enlazador-V<sub>H2</sub>-COOH

50 La principal diferencia a destacar es la colocación distinta de las correspondientes regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada (V<sub>H1</sub>/V<sub>L1</sub> y V<sub>H2</sub>/V<sub>L2</sub>) con respecto entre sí en las dos configuraciones de la región variable duales. Los correspondientes dominios V<sub>L1</sub> y V<sub>H1</sub> estaban ambos en el extremo N de las cadenas ligeras y pesadas en la configuración de la región variable dual. En contraste, en la configuración de entrecruzamiento, la mitad de un par de una región variable de anticuerpo se separó espacialmente dentro de la cadena de proteína en la configuración de entrecruzamiento. En la configuración de entrecruzamiento, el dominio V<sub>L1</sub> sería en el extremo N-

terminal de la cadena ligera de la proteína, pero el emparejamiento del dominio  $V_{H1}$  está en el extremo C de la cadena pesada de configuración de entrecruzamiento. La relación espacial entre  $V_{L1}$  y  $V_{H1}$  encontrada en la configuración de la región variable dual es la disposición que se encuentra en los anticuerpos naturales.

5 Una desventaja potencial de la configuración de Fv dual es que el enlazador  $L_L$  que separa las dos regiones variables sobresale en el sitio de unión al antígeno del dominio Fv2 (véase la Figura 1). Esta protuberancia puede interferir con la unión del antígeno y resultar en una accesibilidad perturbada del Antígeno 2 a Fv2. Esta accesibilidad perturbada o interferencia puede impedir la unión a antígenos. Además, esta interferencia podría ser más pronunciada cuando el tamaño del antígeno 2 es mayor. De hecho, se ha documentado en la Patente de EE.UU. N° 7.612.181 que la afinidad de unión y la capacidad de neutralización de una molécula de DVD-Ig depende de qué especificidad para antígeno esté presente en el extremo N o el extremo C. Véase la Patente de EE.UU.N° 7.612.181, Ejemplo 2.

15 Por lo tanto, para crear proteínas de unión similares a anticuerpos más estables que no estén sujetas a la pérdida de afinidad de antígeno en comparación con el anticuerpo parental, se diseñaron y construyeron moléculas de la región variable dual de entrecruzamiento que tienen un dominio  $C_L$  en la cadena ligera y una región Fc en la cadena pesada. Los polipéptidos que forman estas proteínas similares a anticuerpos tienen las estructuras mostradas más adelante, en que se indica la orientación amino a carboxilo terminal de las cadenas polipeptídicas:

- (e) cadena ligera:  $NH_2-V_{L1}$ -Enlazador- $V_{L2}$ - $C_L$ -COOH
- (f) cadena pesada:  $NH_2-V_{H2}$ -Enlazador- $V_{H1}$ - $C_{H1}$ -Fc-COOH

20 Para evaluar si este diseño de proteína similar a anticuerpo biespecífica podría unirse a dos antígenos diferentes, se utilizaron dos regiones variables previamente generadas y humanizadas de anticuerpos específicos para IL-4 (anti-IL4 parental humanizado) e IL13 (anti-IL13 parental humanizado) para construir moléculas similares a anticuerpos biespecíficas mostradas en la Tabla 1. La secuenciación de los anticuerpos de ratón y el proceso de humanización se han descrito en la Publicación Internacional N° WO 2009/052081 (TBTI). En síntesis, las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras variables del clon B-B13 de anti-IL13 murina y el clon 8D4-8 de anti-IL4 murina se determinaron mediante secuenciación de aminoácidos. Las secuencias murinas fueron humanizadas y luego se volvieron a traducir en secuencias de nucleótidos tal como se describe en el Ejemplo 5 de la Publicación Internacional N° WO 2009/052081. Las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  anti-IL4 parentales humanizadas y  $V_H$  y  $V_L$  anti-IL13 parentales humanizadas se combinaron y se dispusieron tal como se muestra en la Tabla 1. Los códigos abreviados en la columna uno de la Tabla 1 fueron creados para simplificar la discusión de estas proteínas de unión similares a anticuerpos. Las proteínas de unión similares a anticuerpos difieren en el tamaño del enlazador insertado entre las dos regiones variables tal como se muestra en la Tabla 1. Las moléculas de ADN que codifican los polipéptidos mostrados en la Tabla 1 fueron generadas a partir de los anticuerpos anti-IL-4 y anti-IL13 parentales retrotraducidos. Los dominios  $C_{H1}$ ,  $C_L$  y Fc se obtuvieron de IGHG1 (GenBank N° de Acceso 569F4) e IGKC (GenBank N° de Acceso Q502W4).

35 **Tabla 1. Inmunoglobulinas de Doble Cabeza de Entrecruzamiento**

Código Abreviado para Proteína	Descripción de la Proteína	SEQ ID NO:
Cadena Ligera de anti-IL4 Parental	anti-IL4 $V_L$	1
Cadena Pesada de anti-IL4 Parental	anti-IL4 $V_H$	2
Cadena Ligera de anti-IL13 Parental	anti-IL13 $V_L$	3
Cadena Pesada de anti-IL13 Parental	anti-IL13 $V_H$	4
<b><u>Códigos de Cadena Pesada</u></b>		
IL13(G4S)IL4CH1-Fc	anti-IL13 $V_H$ -(G4S)-anti-IL4 $V_H$ - $C_{H1}$ -Fc	5
IL13(G4S2)IL4CH1-Fc	anti-IL13 $V_H$ -(G4S) <sub>2</sub> -anti-IL4 $V_H$ - $C_{H1}$ -Fc	6



Código Abreviado para Proteína	Descripción de la Proteína	SEQ ID NO:
IL4(G4S)IL13CH1-Fc	anti-IL4 V <sub>H</sub> -(G <sub>4</sub> S)-anti-IL13V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -Fc	7
IL4(G4S2)IL13CH1-Fc	anti-IL4 V <sub>H</sub> -(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -anti-IL13V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -Fc	8
<b><u>Códigos de Cadena Ligera</u></b>		
IL13(G4S)IL4CL	anti-IL13 V <sub>L</sub> -(G <sub>4</sub> S)-anti-IL4 V <sub>L</sub> -CL	9
IL13 (G4S2)IL4CL	anti-IL13 V <sub>L</sub> -(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -anti-IL4 V <sub>L</sub> -CL	10
IL4(G4S)IL13CL	anti-IL4 V <sub>L</sub> -(G <sub>4</sub> S)-anti-IL13 V <sub>L</sub> -CL	11
IL4(G4S2)IL13CL	anti-IL4 V <sub>L</sub> -(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -anti-IL13 V <sub>L</sub> -CL	12

5 Las combinaciones de proteínas mostradas en la Tabla 2 se expresaron mediante transfección transitoria y se purificaron por cromatografía de Proteína A. En cada caso, la cromatografía de exclusión por tamaño reveló menos de 12% de agregación, teniendo la mayoría menos de 7% de agregación; pero se encontró que ninguna de las inmunoglobulinas de doble cabeza de entrecruzamiento exhibía capacidad alguna de unirse a IL-4 o IL-13. Sin embargo, no se pudo detectar ninguna unión similar a anticuerpo, y las razones de esta falta de actividad no se pudo establecer. Se predijo anteriormente que esta disposición podría mostrar una estabilidad superior a lo largo del los anticuerpos de dominio de la región variable dual descritos en la Patente de EE.UU. N° 7.612.181 y la Publicación Internacional N° WO 2009/052081.

Tabla 2. Unión de CODH-Ig a IL4 e IL13

Combinación de Proteínas	Agregación	Unión a IL4	Unión a IL13
anti-IL13 V <sub>H</sub> -(G <sub>4</sub> S)-anti-IL4 V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -Fc	5,4%	ND*	ND
anti-IL4 V <sub>L</sub> -(G <sub>4</sub> S)-anti-IL13 V <sub>L</sub> -C <sub>L</sub>			
anti-IL13 V <sub>H</sub> -(G <sub>4</sub> S)-anti-IL4 V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -Fc	6,3%	ND	ND
anti-IL4 V <sub>L</sub> -(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -anti-IL13 V <sub>L</sub> -C <sub>L</sub>			
anti-IL13 V <sub>H</sub> -(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -anti-IL4 V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -Fc	11,5%	ND	ND
anti-IL4 V <sub>L</sub> -(G <sub>4</sub> S)-anti-IL13 V <sub>L</sub> -C <sub>L</sub>			
anti-IL13 V <sub>H</sub> -(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -anti-IL4 V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -Fc	10,1%	ND	ND
anti-IL4 V <sub>L</sub> -(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -anti-IL13 V <sub>L</sub> -C <sub>L</sub>			
anti-IL4 V <sub>H</sub> -(G <sub>4</sub> S)-anti-IL13 V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -Fc	2,7%	ND	ND
anti-IL13 V <sub>L</sub> -(G <sub>4</sub> S)-anti-IL4 V <sub>L</sub> -C <sub>L</sub>			
anti-IL4 V <sub>H</sub> -(G <sub>4</sub> S)-anti-IL13 V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -Fc	3,6%	ND	ND
anti-IL13 V <sub>L</sub> -(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -anti-IL4 V <sub>L</sub> -C <sub>L</sub>			
anti-IL4 V <sub>H</sub> -(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -anti-IL13 V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -Fc	2,9%	ND	ND
anti-IL13 V <sub>L</sub> -(G <sub>4</sub> S)-anti-IL4 V <sub>L</sub> -C <sub>L</sub>			
anti-IL4 V <sub>H</sub> -(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -anti-IL13 V <sub>H</sub> -C <sub>H1</sub> -Fc anti-IL13 V <sub>L</sub> -(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> -anti-IL4 V <sub>L</sub> -C <sub>L</sub>	10,8%	ND	ND

\* ND significa ninguna detectada

### Ejemplo 2. Diseño de Proteínas CODV-Ig mediante Modelado Molecular

- 5 Para obtener proteínas similares a anticuerpos completamente funcionales utilizando la configuración de doble cabeza de entrecruzamiento que son modificables a la incorporación de los dominios Fc y C<sub>L1</sub>, se desarrolló un protocolo de modelado molecular para la inclusión y la evaluación de diferentes enlazadores entre los dominios constante y variable y entre los dominios variables de las cadenas tanto pesadas como ligeras. La cuestión era si la adición de enlazadores únicos entre cada interfaz de dominio constante/variable y entre las dos interfaces de dominio variable/variable en las cadenas tanto pesadas como ligeras permitiría que se produjera un plegamiento adecuado de la proteína y produjera moléculas similares a anticuerpos funcionales en la configuración de la región variable dual de entrecruzamiento (véase la Figura 2). En otras palabras, se evaluaron un total de cuatro enlazadores independientes y únicos (véase la Figura 2). Este protocolo de modelado molecular se basó en el acoplamiento proteína-proteína de modelos de homología y modelos experimentales de las regiones F<sub>VIL4</sub> y F<sub>VIL13</sub>, respectivamente, en combinación con enlazadores apropiados entre las regiones F<sub>VIL4</sub> y F<sub>VIL13</sub> y entre las regiones F<sub>v</sub> y constante o Fc.
- 10
- 15

- A los enlazadores independientes se les asignaron nombres únicos como sigue: L<sub>1</sub> se refiere al enlazador entre V<sub>L</sub> N-terminal y V<sub>L</sub> C-terminal en la cadena ligera; L<sub>2</sub> se refiere al enlazador entre V<sub>L</sub> C-terminal y C<sub>L</sub> en la cadena ligera; L<sub>3</sub> se refiere al enlazador entre V<sub>H</sub> N-terminal y el V<sub>H</sub> C-terminal en la cadena pesada; L<sub>4</sub> se refiere al enlazador entre el V<sub>H</sub> C-terminal y C<sub>H1</sub> (y Fc) en la cadena pesada. Cabe señalar que las designaciones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se refieren sólo a la ubicación del dominio en una cadena de proteína particular en el formato final. Por ejemplo, V<sub>H1</sub> y V<sub>H2</sub> podrían derivarse de dominios V<sub>L1</sub> y V<sub>L2</sub> en los anticuerpos parentales y se colocan en las posiciones V<sub>H1</sub> y V<sub>H2</sub> en una CODV-Ig. Del mismo modo, V<sub>L1</sub> y V<sub>L2</sub> se podrían derivar de dominios V<sub>H1</sub> y V<sub>H2</sub> en los anticuerpos parentales y se colocan en las posiciones V<sub>H1</sub> y V<sub>H2</sub> en una CODV-Ig. Por lo tanto, las designaciones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se refieren a la ubicación actual y no a la ubicación original en un anticuerpo parental.
- 5
- 10 En más detalle, se construyó un modelo de homología de Fv<sub>IL4</sub> en entradas AP 1YLD (cadena ligera) y 1IQW (cadena pesada). El dímero Fv<sub>IL4</sub> se recompuso en una estructura cristalina interna del complejo IL13 / anti-IL13 Fab<sub>IL13</sub> y se optimizó. Con el fin de obtener una estimación del volumen requerido por IL4 cuando se une a Fv<sub>IL4</sub>, la estructura cristalina de IL4 (1RCB.pdb) fue acoplada al modelo de homología de Fv<sub>IL4</sub>. A continuación, se generaron veintidós modelos putativos del complejo que merecían una mayor consideración.
- 15 Paralelamente, el modelo de homología de Fv<sub>IL4</sub> se acopló a Fv<sub>IL13</sub> extraído de una estructura cristalina interna del complejo IL13/Fab<sub>IL13</sub>. Se encontró que una solución superior permitía la construcción de enlazadores relativamente cortos, al tiempo que no muestran interferencia estérica para la unión al antígeno y la colocación de los dominios constantes como fue el caso para las inmunoglobulinas de la región variable dual (véase la Figura 3). En esta disposición Fv<sub>IL4</sub> (V<sub>L1</sub>) se colocó en el extremo N de la cadena ligera, seguido de Fv<sub>IL13</sub> (V<sub>L2</sub>) y Fc (C<sub>L1</sub>) en el extremo C de la cadena ligera. En la cadena pesada, Fv<sub>IL13</sub> (V<sub>H2</sub>) se colocó en posición N-terminal, seguido de Fv<sub>IL4</sub> (V<sub>H1</sub>) y las regiones constantes (C<sub>H1</sub> - C<sub>H2</sub> - C<sub>H3</sub>).
- 20
- 25 Tal como se muestra en la Tabla 3, los modelos de la cadena ligera sugirieron que el enlazador L<sub>1</sub> entre los dominios V<sub>L1</sub> y V<sub>L2</sub> y el enlazador L<sub>2</sub> entre los dominios V<sub>L2</sub> y C<sub>L1</sub> debería ser entre uno a tres y cero a dos residuos glicina de longitud, respectivamente. Modelos de la cadena pesada sugirieron que el enlazador L<sub>3</sub> entre los dominios V<sub>H2</sub> y V<sub>H1</sub> y el enlazador L<sub>4</sub> entre los dominios V<sub>H1</sub> y C<sub>H1</sub> debe ser entre dos y seis y cuatro a siete residuos glicina de longitud, respectivamente (véase la Tabla 3 y la Figura 2). En este ejemplo, la glicina se utilizó como un aminoácido prototípico para los enlazadores, pero otros residuos de aminoácidos también pueden servir como enlazadores. La estabilidad estructural de los modelos propuestos se verificó mediante la optimización de las conformaciones de los enlazadores, la minimización y los cálculos de dinámica molecular. La combinación sistemática entre cuatro construcciones de cadena ligera y seis construcciones de cadena pesada resultó en 24 posibles proteínas de unión similares a anticuerpos anti-IL-4 y anti-IL13 biespecíficas de región variable dual de entrecruzamiento (véase la Tabla 4).
- 30

**Tabla 3. Longitudes de Enlazador Propuestas**

Enlazador Entre	Inserción Máxima del Enlazador	Inserción Mínima del Enlazador	Nombre del Enlazador
V <sub>L1</sub> -V <sub>L2</sub>	Gly <sub>3</sub>	Gly	L <sub>1</sub>
V <sub>L2</sub> -C <sub>L</sub>	Gly <sub>2</sub>	None	L <sub>2</sub>
V <sub>H2</sub> -V <sub>H1</sub>	Gly <sub>6</sub>	Gly <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>
V <sub>H1</sub> -C <sub>H1</sub>	Gly <sub>7</sub>	Gly <sub>4</sub>	L <sub>4</sub>

**Tabla 4. CODV-Ig para Expresión**

Código*	Cadenas Pesadas (extremo N a C)	SEQ ID NO:
HC1	IL13 V <sub>H</sub> -(Gly6)-IL4 V <sub>H</sub> -(Gly7)-C <sub>H1</sub> -Fc	13
HC2	IL13 V <sub>H</sub> -(Gly6)-IL4 V <sub>H</sub> -(Gly4)- C <sub>H1</sub> -Fc	14
HC3	IL13 V <sub>H</sub> -(Gly2)-IL4 V <sub>H</sub> -(Gly7)- C <sub>H1</sub> -Fc	15
HC4	IL13 V <sub>H</sub> -(Gly2)-IL4 V <sub>H</sub> -(Gly4)- C <sub>H1</sub> -Fc	16
HC5	IL13 V <sub>H</sub> -(Gly4)-IL4 V <sub>H</sub> -(Gly7)- C <sub>H1</sub> -Fc	17
HC6	IL13 V <sub>H</sub> -(Gly4)-IL4 V <sub>H</sub> -(Gly4)- C <sub>H1</sub> -Fc	18
Código*	Cadenas Ligeras (extremo N a C)	
LC1	IL4 V <sub>L</sub> -(Gly3)-IL13 V <sub>L</sub> -C <sub>L1</sub>	19
LC2	IL4 V <sub>L</sub> -(Gly)-IL13 V <sub>L</sub> - C <sub>L1</sub>	20
LC3	IL4 V <sub>L</sub> -(Gly3)-IL13 V <sub>L</sub> -(Glv2)- C <sub>L1</sub>	21
LC4	IL4 V <sub>L</sub> -(Gly)-IL13 V <sub>L</sub> -(Gly2)- C <sub>L1</sub>	22
C <sub>L1</sub>	dominio constante de la cadena ligera C <sub>L1</sub> humano	23
C <sub>H1</sub> -Fc	dominio constante de la cadena pesada C <sub>H1</sub> humano y región Fc	24
Gly4	enlazador peptídico con 4 glicinas (GGGG)	25
Gly5	enlazador peptídico con 5 glicinas (GGGGG)	26
Glv6	enlazador peptídico con 6 glicinas (GGGGGG)	27
Gly7	enlazador peptídico con 7 glicinas (GGGGGGG)	28
Gly8	enlazador peptídico con 8 glicinas (GGGG GGGG)	29

\*Se diseñó un código corto para representar las estructuras asociadas. Los códigos que comienzan con HC representan la cadena pesada adyacente, y los códigos que comienzan con LC representan la cadena ligera adyacente.

En la Tabla 4, no se incluye el prefijo "anti", sino que pretende dar a entender que significa que IL13 se refiere a anti-IL13 e IL4 se refiere a anti-IL4.

### Ejemplo 3. Generación de Plásmidos de Expresión de CODV-Ig

5 Moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y ligeras variables de las seis cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras descritas en la Tabla 4 fueron generadas por síntesis de genes en Geneart (Regensburg, Alemania). Los dominios de cadena ligera variable se fusionaron a la cadena ligera constante (IGKC, GenBank N° de Acceso Q502W4) por digestión con las endonucleasas de restricción ApaLI y BsiWI y, posteriormente, se ligaron en los sitios ApaLI/BsiWI del vector de expresión episomal pFF, un análogo del vector pTT descrito por Durocher *et al.*, (2002, *Nucl. Acids Res.* 30(2): E9), creando el plásmido de expresión en mamíferos para la expresión de las cadenas ligeras.

15 Los dominios de cadena pesada variable se fusionaron a la variante "Ted" de la cadena humana pesada constante (IGHG1, GenBank N° de Acceso 569F4) o, alternativamente, a un dominio C<sub>H1</sub> marcado con 6x His de IGHG1 constante humana con el fin de crear un Fab biespecífico. A continuación, el dominio V<sub>H</sub> se digirió con las endonucleasas de restricción ApaLI y ApaI y después se fusionó al IGHG1 o al dominio C<sub>H1</sub> marcado con 6x His, respectivamente, por ligadura en los sitios ApaLI/ApaI del vector de expresión episomal pFF, creando los plásmidos de expresión de mamífero para la expresión de las cadenas pesadas (IgG1 o Fab, respectivamente).

### Ejemplo 4. Expresión de CODV-Ig

20 Los plásmidos de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras de las construcciones correspondientes se propagaron en células DH5a de *E. coli*. Los plásmidos utilizados para la transfección se prepararon a partir de *E. coli* utilizando el kit EndoFree Plasmid Mega de Qiagen.

Células HEK 293-FS que crecen en Medio Freestyle (Invitrogen) fueron transfectadas con plásmidos LC y HC indicados que codifican las cadenas pesadas y las cadenas ligeras mostradas en la Tabla 4 utilizando reactivo de transfección 293fectin (Invitrogen) tal como se describe por el fabricante. Después de 7 días, las células se separaron por centrifugación y el sobrenadante se pasó por un filtro de 0,22 µm para separar partículas.

25 Construcciones de CODV-IgG1 se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas de Proteína A (Columnas HP de Proteína A HiTrap, GE Life Sciences). Después de la elución de la columna con tampón acetato 100 mM y NaCl 100 mM, pH 3,5, las construcciones de CODV-IgG1 se desalaron utilizando Columnas de Desalinización HiPrep 26/10, formuladas en PBS a una concentración de 1 mg/mL y se filtraron utilizando una membrana de 0,22 µm.

30 Construcciones biespecíficas de CODV Fab se purificaron mediante IMAC en columnas HiTrap IMAC HP (GE Life Sciences). Después de la elución de la columna con un gradiente lineal (tampón de elución: fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 50-500 mM, pH 7,4), la proteína que contiene fracciones se agrupó y se desaló utilizando Columnas de Desalinización HiPrep 26/10, se formuló en PBS a una concentración de 1 mg/mL y se filtró utilizando una membrana de 0,22 µm.

35 La concentración de proteína se determinó por medición de la absorbancia a 280 nm. Cada uno de los lotes se analizó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras para determinar la pureza y el peso molecular de cada subunidad y del monómero.

40 Una placa Nunc F96-MaxiSorp-Inmuno se recubrió con IgG anti-humana de cabra (específica para Fc) [NatuTec A80-104A]. El anticuerpo se diluyó a 10 µg/ml en tampón de recubrimiento de carbonato (carbonato de sodio 50 mM, pH 9,6) y se dispensó a 50 µL por pocillo. La placa se selló con cinta adhesiva y se almacenó durante la noche a 4°C. La placa se lavó tres veces con tampón Wash (PBS, pH 7,4 y Tween 20 al 0,1%). 150 µL de disolución de bloqueo (BSA / PBS al 1%) se dispensó en cada pocillo para cubrir la placa. Después de 1 hora a temperatura ambiente, la placa se lavó tres veces con tampón Wash. Se añadieron 100 µL de muestra o patrones (en un intervalo de 1500 ng/ml a 120 ng/ml) y se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con tampón Wash. Se añadieron 100 µL de conjugado de IgG-FC anti-humano de cabra - HRP [NatuTec A80-104P-60] diluido en la relación 1:10.000 utilizando disolución de incubación (BSA al 0,1%, PBS, pH 7,4, y Tween 20 al 0,05%). Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, la placa se lavó tres veces con tampón Wash. 100 µL de sustrato ABTS (comprimido de 10 mg de ABTS (Pierce 34026) en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, disolución de ácido cítrico 0,05 M, pH 5,0). La adición de 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%/ 10 ml de tampón Sustrato antes de su uso) se dispensó a cada uno de los pocillos, y se dejó que el color se desarrollara. Después de que el color se hubiese desarrollado (aproximadamente 10 a 15 minutos), se añadieron 50 µL de disolución de SDS al 1% para detener la reacción. La placa se leyó a A<sub>405</sub>.

**Ejemplo 5. Caracterización de Variantes de CODV-Ig**

Para determinar si las cadenas pesadas y ligeras de proteína similar a anticuerpo CODV-Ig se apareaban y plegaban correctamente, se midió el nivel de agregación mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC). La SEC analítica se realizó en parejas ensambladas utilizando un explorador AKTA 10 (GE Healthcare) equipado con una columna de TSKgel G3000SWXL (7,8 mm x 30 cm) y la columna de seguridad de TSKgel SWXL (Tosoh Bioscience). El análisis se realizó a 1 ml/min utilizando NaCl 250 mM, fosfato de Na100 mM, pH 6,7, con detección a 280 nm. 30  $\mu$ L de muestra de proteína (a 0,5-1 mg/ml) se aplicaron a la columna. Para la estimación del tamaño molecular, la columna se calibró utilizando una mezcla estándar de filtración en gel (MWGF-1000, Sigma Aldrich). La evaluación de los datos se realizó utilizando el software UNICORN v5.11.

La Tabla 5 muestra los resultados de la primera serie de 24 diferentes moléculas de CODV-Ig hechas utilizando las combinaciones de la región variable de anti-IL4 y anti-IL13 que se describen en la Tabla 4. Los códigos asignados en la Tabla 4 representan las estructuras adyacentes que se muestran en la Tabla 4. Para los pares de cadena ligera y cadenas pesadas en donde se producía proteína, los niveles de agregación se midieron utilizando SEC. Los resultados se muestran en la Tabla 5, en donde LC4 ( $L_1 = 1$ ;  $L_2 = 2$ ) tuvo más éxito en el apareamiento con las seis cadenas pesadas. LC4 corresponde a la estructura de IL-4  $V_L$ - (Gly) -IL13  $V_L$ - (Gly2)- $C_{L1}$  con el enlazador  $L_1$  igual a 1, en donde un único residuo aminoácido separa los dos dominios  $V_L$  de la cadena ligera de la región variable dual. Además, LC4 tenía  $L_2$  igual a 2, que contenía un enlazador dipéptido Gly-Gly entre el  $V_L$  central y el  $C_{H1}$  C-terminal.

**Tabla 5. Niveles de Agregación Entre Pares de Cadenas Pesadas y Ligeras**

	HC1	HC2	HC3	HC4	HC5	HC6
LC1	>50%	>50%	ND*	ND	ND	ND
LC2	ND	ND	ND	>50%	ND	ND
LC3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LC4	7.2%	6.8%	6.8%	7.1%	6.3%	5.9%

\*ND indica que no se produjo proteína

En los casos en los que se produjeron moléculas de CODV-Ig, se llevó a cabo un experimento BIACORE de una sola concentración a concentraciones de IL-4 e IL-13 intermedias para verificar la unión a antígenos diana. Moléculas similares a anticuerpos CODV-Ig correspondientes a las combinaciones LC4:HC4 y LC4:HC6 descritas en la Tabla 4 fueron elegidos para la evaluación de un análisis cinético completo utilizando la resonancia de plasmones de superficie.

Tal como se representa en la Tabla 5, la mayoría de las moléculas de CODV-Ig no se podían producir en absoluto o sólo en forma de agregados (hasta 90%). Las combinaciones de cadena pesada/ cadena ligera que dan lugar a niveles de agregación aceptables (5-10%) después de una etapa de cromatografía fueron los combinados con la cadena ligera de IL-4  $V_L$ -(Gly)-IL13  $V_L$ -(Gly2)- $C_{L1}$ . La cadena ligera fue la cadena más meticulosa dentro de estas variantes de CODV-Ig y sirvió como plataforma para aceptar diferentes cadenas pesadas con diferentes composiciones de enlazador.

**1. Análisis cinético**

Se seleccionaron dos pares de cadenas pesadas y ligeras para el análisis cinético completo. IL13 e IL4 humanas recombinantes se adquirieron de Chemicon (EE.UU.). La caracterización cinética de los anticuerpos purificados se llevó a cabo utilizando la tecnología de resonancia de plasmones de superficie en un BIACORE 3000 (GE Healthcare). Un ensayo de captura utilizando un anticuerpo específico para especies (p. ej., MAB 1302 específico para Fc humano, Chemicon) se utilizó para la captura y la orientación de los anticuerpos investigados. El anticuerpo de captura se inmovilizó a través de grupos amina primaria (11.000 RU) en un chip CM5 de calidad para investigación (GE Life Sciences) utilizando procedimientos estándares. El anticuerpo analizado fue capturado a un caudal de 10  $\mu$ L/min con un valor de RU ajustado que resultaría en la unión de analito máxima de 30 RU. Las cinéticas de unión se midieron frente a IL4 e IL13 humanas recombinantes en un intervalo de concentraciones entre 0 y 25 nM en HBS EP (HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,005%) a un

caudal de 30  $\mu$ l/min. Las superficies de chips se regeneraron con glicina 10 mM, pH 2,5. Los parámetros cinéticos se analizaron y se calcularon en el paquete de programas v4.1 de BIAevaluation utilizando una celda de flujo sin anticuerpo capturado como referencia.

5 La Tabla 6 muestra la comparación de la cinética de los anticuerpos BB13 (anti-IL13) y 8D4 (anti-IL-4) parentales (expresados como IgGs) con los dominios respectivos dentro del formato CODV-Ig (Tabla 4, Códigos de LC4:HC4 y LC4:HC6). Tal como se muestra en la Tabla 6, las construcciones de CODV-Ig no exhibían propiedades de unión reducidas frente a los antígenos correspondientes, en comparación con los anticuerpos anti-IL13 y anti-IL4 parentales. La pérdida en la tasa de enlace observada en el formato DVD-Ig/TBTI utilizando las mismas secuencias de Fv no se produjo con la configuración CODV-Ig. Los sitios de unión que miran en dirección opuesta deben 10 permitir la unión de grandes antígenos o el puenteo de células diferentes con una configuración similar a anticuerpo biespecífica, y también sería adecuado para una selección más amplia de anticuerpos parentales. Una ventaja adicional de la CODV-Ig era que no hay residuos de enlazador que sobresalgan en el sitio de unión al antígeno y que reduzcan la accesibilidad del antígeno.

**Tabla 6. Análisis Cinético de LC4:HC4 y LC4:HC6**

Código		Tasa de Enlace [1/Ms]	Tasa de Desenlace [1/s]	KD [M]
	mAb anti-IL4 parental	2,49E+07	1,95E-04	7,83E-12
	mAb anti-IL13 parental	1,59E+06	1,30E-04	8,18E-11
LC4:HC4	CODV-Ig con IL4	3,16E+07	2,89E-04	9,14E-12
LC4:HC4	CODV-IG con IL13	1,20E+06	1,12E-04	9,34E-11
LC4:HC6	CODV-Ig con IL4	2,97E+07	3,30E-04	1,11E-11
LC4:HC6	CODV-IG con IL13	1,39E+06	1,63E-04	1,18E-10

## 15 **2. Co-inyección de IL4 e IL13 para la Demostración de la Unión de Antígeno Aditivo por CODV-Ig**

Para investigar la unión aditiva de los dos antígenos, se aplicó un método de co-inyección con asistente en el que se inyectó inmediatamente un antígeno seguido por el otro antígeno después de un tiempo de retraso (IL4, después IL13, y viceversa). El nivel de unión resultante se puede comparar con el que se consigue con una mezcla 1: 1 de los dos antígenos en la misma concentración. Con el fin de demostrar la unión aditiva de ambos antígenos IL4 y IL13 20 por las moléculas de CODV-Ig, se llevó a cabo un experimento BIACORE con una combinación CODV-Ig [HC4:LC4] por co-inyección de ambos antígenos en tres ciclos de análisis separados (véase la Figura 4). La co-inyección se realizó con IL4 3,125 nM/IL13 25 nM (y viceversa) y con una mezcla 1:1 de IL4 3,125 nM e IL13 25 nM. Una co-inyección de tampón HBS-EP se hizo como una referencia. En un punto de 800 segundos, se logró un nivel de unión idéntico de 63 RU después de la inyección de la mezcla de antígenos o de la co-inyección de los antígenos, 25 independientemente de la secuencia de co-inyección. Cuando la proteína CODV-Ig había sido saturada por el primer antígeno (IL4), se inyectó el segundo antígeno (IL13) y se observó una segunda señal de unión. Esta observación se reprodujo cuando se invirtió la secuencia de la inyección del antígeno. Esto demuestra la unión aditiva y la no inhibición de la unión de ambos antígenos por la CODV-Ig. Por lo tanto, la construcción CODV-Ig fue capaz de unir ambos antígenos simultáneamente (es decir, exhiben biespecificidad) saturando todos los sitios de unión (es decir, exhiben tetravalencia). 30

### **Ejemplo 6. Tolerancia de las Longitudes de Enlazador para CODV-Ig**

La tolerancia para los enlazadores de diferentes longitudes se evaluó mediante la construcción de moléculas de CODV-Ig que tienen diferentes combinaciones de longitudes de enlazador para  $L_1$ ,  $L_2$  en la cadena ligera y para  $L_3$  y  $L_4$  en la cadena pesada. Construcciones de CODV-Ig se generaron con enlazadores de la cadena pesada  $L_3$  y  $L_4$  35 que varían entre 1 y 8 residuos para  $L_3$  y 0 ó 1 residuo para  $L_4$ . La cadena pesada contenía anti-IL4 como el dominio de unión N-terminal y anti-IL13 como el dominio de unión C-terminal, seguido de  $C_{H1}$ -Fc. Los enlazadores de la cadena ligera  $L_1$  y  $L_2$  se variaron de 3 a 12 residuos para  $L_1$  y de 3 a 14 residuos para  $L_2$ . La cadena ligera contenía anti-IL13 como el dominio de unión N-terminal y anti-IL4 como el dominio de unión C-terminal seguido de  $C_{L1}$ .

### 1. Caracterización de Variantes CODV-Ig

La determinación del nivel de agregación se realizó por cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC). La SEC analítica se realizó utilizando un explorador ÅKTA 10 (GE Healthcare) equipado con una columna TSKgel G3000SWXL (7,8 mm x 30 cm) y una columna de seguridad TSKgel SWXL (Tosoh Bioscience). El análisis se realizó a 1 ml/min utilizando NaCl 250 mM, fosfato de Na 100 mM, pH 6,7, con detección a 280 nm. 30 µL de muestra de proteína (a 0,5-1 mg/ml) se aplicó en la columna. Para la estimación del tamaño molecular, la columna se calibró utilizando una mezcla estándar de filtración en gel (MWGF-1000, SIGMA Aldrich). La evaluación de los datos se realizó utilizando el software UNICORN v5.11.

IL13 e IL4 humanas recombinantes se adquirieron de Chemicon (EE.UU.). TNF- $\alpha$  humano recombinante se adquirió de Sigma Aldrich (H8916-10 µg), IL-1 $\beta$  humana recombinante (201-LB/CF), IL-23 humana recombinante (1290-IL/CF), EGFR humana recombinante (344 ER) y HER2 humana recombinante (1129-ER-50) se adquirieron de R&D Systems.

El análisis de unión cinética por Biacore se realizó como sigue. Se utilizó la tecnología de resonancia de plasmones de superficie en un Biacore 3000 (GE Healthcare) para la caracterización cinética detallada de los anticuerpos purificados. Un ensayo de captura utilizando un anticuerpo específico para la especie (p. ej., MAB 1302 específico para Fc humano, Chemicon) se utilizó para la captura y la orientación de los anticuerpos investigados. Para la determinación de las cinéticas de unión de IL4 e IL13, se capturaron los correspondientes CODV Fabs como en el Ejemplo 10, Tabla 12 utilizando el kit de captura de Fab anti-humano (GE Healthcare). El anticuerpo de captura se inmovilizó a través de grupos amina primaria (11000 RU) en un chip CM5 de calidad para investigación (GE Life Sciences) utilizando procedimientos estándares. El anticuerpo analizado fue capturado a un caudal de 10 µL/min con un valor ajustado RU que resultaría en la unión de analito máxima de 30 RU. Las cinéticas de unión se midieron frente a IL4 humana recombinante e IL13 en un intervalo de concentraciones entre 0 y 25 nM en HBS EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005%) a un caudal de 30 µL/min. Las superficies de los chips se regeneraron con glicina 10 mM pH 2,5. Los parámetros cinéticos se analizaron y se calcularon en el paquete de programas v4.1 de BIAevaluation utilizando una celda de flujo sin anticuerpo capturado como referencia.

Las afinidades de unión de CODV-Ig, CODV-Fab y TBTI frente a EGFR y HER2 se midieron utilizando un sistema de matriz de interacción de proteínas Proteon XPR36 (Biorad). Los antígenos fueron inmovilizados por acoplamiento de amina reactiva en chips sensores GLC (BioRad). Series de dilución de las variantes de anticuerpos biespecíficos en tampón PBSET (Biorad) se analizaron en paralelo en un modo de cinética de un solo disparo con doble referencia. Los datos se analizaron utilizando el Software Proteon Manager v3.0 (Biorad) con el modelo de Langmuir 1:1 con transferencia de masa modelo o modelo de analito bivalente.

La Tabla 7 resume los resultados para el rendimiento, la agregación (tal como se mide por cromatografía de exclusión por tamaño) y la afinidad de unión para CODV-Ig que tienen diferentes combinaciones de tamaños de los enlazadores. Los resultados revelaron que las moléculas de Ig-CODV, en las que L<sub>2</sub> fue cero en general no podían ser producidos, o en los casos en los que se produjo la proteína, había un alto nivel de agregación (véanse Lotes con N<sup>o</sup>s de ID 101, 102, 106-111 y 132-137 en la Tabla 7). Por lo tanto, en contraposición con la predicción de modelado molecular del Ejemplo 2, en que L<sub>2</sub> igual a cero estaba dentro del intervalo aceptable, estos resultados indican que la transición V<sub>L2</sub>-C<sub>L</sub> (o L<sub>2</sub>) requiere un enlazador de al menos un residuo (véase la Tabla 7).

**Tabla 7. Optimización de los Tamaños de Enlazador para CODV-Ig**

Lote ID	Alineación sobre LC1*	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (Antígeno1) IL4 [pM]	KD (Antígeno2) IL13 [pM]
101	IL4 x IL13	0	0	0	0	n.p.	-	-	-
102	IL4 x IL13	0	0	2	4	1,0	66,4	35	125
103	IL4 x IL13	0	1	2	4	2,0	10,8	4	124
104	IL4 x IL13	0	2	2	4	1,0	10,0	3	137
105	IL4 x IL13	0	2	4	4	2,0	8,5	6	94



ES 2 588 306 T3

Lote ID	Alineación sobre LC1*	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (Antígeno1) IL4 [pM]	KD (Antígeno2) IL13 [pM]
106	IL4 x IL13	1	0	2	4	4,2	61,0	-	-
107	IL4 x IL13	1	0	2	7	n.p.	-	-	-
108	IL4 x IL13	1	0	4	4	n.p.	-	-	-
109	IL4 x IL13	1	0	4	7	n.p.	-	-	-
110	IL4 x IL13	1	0	6	4	3,0	75,0	-	-
111	IL4 x IL13	1	0	6	7	5,6	91,0	-	-
112	IL4 x IL13	1	1	2	4	5,3	8,8	5	55
113	IL4 x IL13	1	2	0	0	2,0	1,9	6	59
114	IL4 x IL13	1	2	0	2	1,0	7,2	4	75
115	IL4 x IL13	1	2	0	4	2,0	8,0	11	62
116	IL4 x IL13	1	2	1	4	3,0	5,7	5	74
117	IL4 x IL13	1	2	12	12	4,0	9,2	7	75
118	IL4 x IL13	1	2	12	9	7,0	11,8	7	74
119	IL4 x IL13	1	2	15	15	10,0	7,9	6	64
120	IL4 x IL13	1	2	2	2	2,0	5,9	6	70
121	IL4 x IL13	1	2	2	4	7,0	7,1	11	118
122	IL4 x IL13	1	2	2	7	6,6	6,8	1	50
123	IL4 x IL13	1	2	4	4	5,8	5,9	9	93
124	IL4 x IL13	1	2	4	7	5,6	6,3	6	51
125	IL4 x IL13	1	2	6	4	7,6	6,8	8	64
126	IL4 x IL13	1	2	6	7	8,2	7,2	9	56
127	IL4 x IL13	1	2	9	12	4,0	8,7	2	83

ES 2 588 306 T3

Lote ID	Alineación sobre LC1*	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (Antígeno1) IL4 [pM]	KD (Antígeno2) IL13 [pM]
128	IL4 x IL13	1	2	9	9	10,2	14,0	12	94
129	IL4 x IL13	1	3	2	4	4,0	4,7	5	70
130	IL4 x IL13	1	4	2	4	7,1	6,0	4	57
131	IL4 x IL13	2	2	2	4	1,0	7,3	5	50
132	IL4 x IL13	3	0	2	4	n.p.	-	-	-
133	IL4 x IL13	3	0	2	7	n.p.	-	-	-
134	IL4 x IL13	3	0	4	4	n.p.	-	-	-
135	IL4 x IL13	3	0	4	7	n.p.	-	-	-
136	IL4 x IL13	3	0	6	4	9,8	93,0	-	-
137	IL4 x IL13	3	0	6	7	5,8	90,0	-	-
138	IL4 x IL13	3	2	2	4	n.p.	-	-	-
139	IL4 x IL13	3	2	2	7	n.p.	-	-	-
140	IL4 x IL13	3	2	4	4	n.p.	-	-	-
141	IL4 x IL13	3	2	4	7	n.p.	-	-	-
142	IL4 x IL13	3	2	6	4	n.p.	-	-	-
143	IL4 x IL13	3	2	6	7	n.p.	-	-	-

\* La alineación en la cadena pesada debe ser IL13V<sub>H</sub>-L<sub>3</sub>-IL4V<sub>H</sub>-L<sub>4</sub>-C<sub>H1</sub>-Fc  
<sup>1</sup> n.p. significa que la construcción no se pudo producir.

5 Además, se encontró que las longitudes de enlazador CODV-Ig descritas anteriormente eran más sensibles a los aumentos en 1 residuo aminoácido que aumentos en 2 residuos aminoácidos. Por ejemplo, mientras que los Lotes de N°s de ID 103 y 104 difieren en 1 residuo aminoácido en L<sub>2</sub>, el Lote de N° de ID 103 muestra 6 veces más agregación y el Lote de N° de ID 104 muestra menos agregación y dos veces el rendimiento. En contraposición, los Lotes de N°s de ID de lote No. 104 y 105, que se diferencian por dos residuos en L<sub>2</sub> exhibían perfiles similares con respecto al rendimiento, la agregación y la unión.

**Ejemplo 7. Cadena Pesada como la Cadena de Molde para CODV-Ig**

10 En los ejemplos 1 a 5, los tamaños de enlazadores cortos óptimos en la cadena ligera sugirieron que la cadena ligera servía como un molde al permanecer en una disposición lineal y que se requerían enlazadores más grandes en la cadena pesada con el fin de que la cadena pesada se plegara correctamente en la configuración de

5 entrecruzamiento para adaptarse a la cadena ligera del molde (véase la Figura 5, Panel A). Seguidamente se evaluó si los enlazadores cortos colocados específicamente en la cadena pesada para mantener una disposición de revestimiento en la cadena pesada hicieron que la cadena pesada fuese la cadena "molde", y si el patrón se repetiría y serían necesarios enlazadores más grandes para permitir que la cadena no molde se plegara correctamente y alojara ahora la cadena pesada del molde (véase la Figura 5, Panel B).

10 La Figura 6 ilustra estos principios de diseño CODV-Ig sobre la base de tener a la cadena ligera o a la cadena pesada como "molde". Para evaluar el carácter genérico de este concepto, se generaron construcciones CODV-Ig con enlazadores de cadena pesada L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> que varía entre 1 y 8 residuos para L<sub>3</sub> y 0 ó 1 residuos para L<sub>4</sub>. La cadena pesada contenía anti-IL4 como el dominio de unión N-terminal y anti-IL13 como el dominio de unión C-terminal seguido de C<sub>H1</sub>-Fc. Los enlazadores de la cadena ligera L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> se variaron de 3 a 12 residuos para L<sub>1</sub> y de 3 a 14 residuos para L<sub>2</sub>. La cadena ligera contenía anti-IL13 como el dominio de unión N-terminal y anti-IL4 como el dominio de unión C-terminal seguido de C<sub>L1</sub>.

15 La Tabla 8 resume los resultados para el rendimiento, la agregación (tal como se mide por cromatografía de exclusión por tamaño) y la afinidad de unión para CODV-Ig que tienen diferentes combinaciones de tamaños de los enlazadores y en donde la cadena pesada se mantiene en una disposición lineal como la cadena de molde y se permite que la cadena ligera se pliegue en una configuración de entrecruzamiento. Los resultados revelaron que no podían producirse las moléculas de CODV-Ig en las que L<sub>4</sub> era generalmente cero, o en los casos en los que se produjo la proteína, había un alto nivel de agregación (similar a las moléculas en las que L<sub>2</sub> era igual a cero) (véanse los Lotes de N°s de ID 207-209, 211-212, 219-224, 231-236, 243-252 y 263-266 en la Tabla 8). Una excepción era el Lote de N° de ID 210, en el que L<sub>1</sub> era 7, L<sub>2</sub> era 5, L<sub>3</sub> era 2 y L<sub>4</sub> era cero. Esta disposición produjo una cantidad suficiente de proteína y tenía un nivel aceptable de la agregación y de unión, lo que sugirió que alguna combinación de los tamaños de enlazador se pudo encontrar para compensar un enlazador de longitud cero en L<sub>4</sub> en algunas circunstancias.

**Tabla 8. Optimización de los Tamaños de Enlazador con Cadena Pesada como Molde**

Lote ID	Alineación sobre HC*	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (Antígeno1) IL4 [pM]	KD (Antígeno2) IL13 [pM]
201	IL4 x IL13	5	3	1	2	6,3	12	4	72
202	IL4 x IL13	5	5	1	2	10,5	7,0	9	54
203	IL4 x IL13	7	3	1	2	19,3	9,4	80	46
204	IL4 x IL13	7	5	1	2	15,3	5,2	3	25
205	IL4 x IL13	10	3	1	2	4,7	4,0	8	58
206	IL4 x IL13	10	5	1	2	9,1	3,9	4	58
207	IL4 x IL13	5	3	2	0	6,7	25,3	3	33
208	IL4 x IL13	5	5	2	0	10,2	18,4	10	77
209	IL4 x IL13	7	3	2	0	16,2	22,2	5	47
210	IL4 x IL13	7	5	2	0	14,7	9,7	4	47
211	IL4 x IL13	10	3	2	0	2,1	12,8	7	53
212	IL4 x IL13	10	5	2	0	7,0	36,3	10	29

ES 2 588 306 T3

Lote ID	Alineación sobre HC*	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (Antígeno1) IL4 [pM]	KD (Antígeno2) IL13 [pM]
213	IL4 x IL13	5	3	2	2	4,0	13,2	5	27
214	IL4 x IL13	5	5	2	2	8,0	7,9	10	53
215	IL4 x IL13	7	3	2	2	14,9	11,5	4	50
216	IL4 x IL13	7	5	2	2	7,5	3,6	11	40
217	IL4 x IL13	10	3	2	2	2,4	4,4	8	79
218	IL4 x IL13	10	5	2	2	4,6	6,6	4	36
219	IL4 x IL13	3	6	3	0	2,1	51,8	8	71
220	IL4 x IL13	3	10	3	0	3,9	59,4	1	42
221	IL4 x IL13	3	14	3	0	1,9	57,6	35	81
222	IL4 x IL13	6	6	3	0	4,0	11,8	7	53
223	IL4 x IL13	6	10	3	0	10,3	16,6	6	23
224	IL4 x IL13	6	14	3	0	5,1	13,5	9	52
225	IL4 x IL13	3	6	3	2	2,8	71,6	6	68
226	IL4 x IL13	3	10	3	2	7,3	65,8	6	64
227	IL4 x IL13	3	14	3	2	1,6	53,6	7	39
228	IL4 x IL13	6	6	3	2	4,0	19,1	7	44
229	IL4 x IL13	6	10	3	2	2,2	15,4	3	14
230	IL4 x IL13	6	14	3	2	4,0	16,2	6	76
231	IL4 x IL13	5	3	5	0	n.p.	-	-	-
232	IL4 x IL13	5	5	5	0	0,6	24,9	8	70
233	IL4 x IL13	7	3	5	0	0,4	15,1	3	113
234	IL4 x IL13	7	5	5	0	1,3	30,7	3	122

ES 2 588 306 T3

Lote ID	Alineación sobre HC*	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (Antígeno1) IL4 [pM]	KD (Antígeno2) IL13 [pM]
235	IL4 x IL13	10	3	5	0	0,1	11,3	2	82
236	IL4 x IL13	10	5	5	0	0,4	18,6	11	112
237	IL4 x IL13	5	3	5	2	2,1	45,3	8.1	101.0
238	IL4 x IL13	5	5	5	2	0,6	45,4	9.3	67.2
239	IL4 x IL13	7	3	5	2	n.p.	-	-	-
240	IL4 x IL13	7	5	5	2	1,6	31,7	4	65
241	IL4 x IL13	10	3	5	2	0,2	14,7	7	119
242	IL4 x IL13	10	5	5	2	1,1	17,6	10	37
243	IL4 x IL13	3	6	6	0	1,6	54,3	5	50
244	IL4 x IL13	3	10	6	0	1,5	63,9	10	10
245	IL4 x IL13	3	14	6	0	1,0	61,5	10	69
246	IL4 x IL13	6	6	6	0	1,1	16,2	6	57
247	IL4 x IL13	6	10	6	0	4,7	27,9	2	41
248	IL4 x IL13	6	14	6	0	0,9	18,1	10	79
249	IL4 x IL13	10	6	6	0	0,3	8,7	3	87
250	IL4 x IL13	10	8	6	0	0,7	21,3	8	53
251	IL4 x IL13	12	6	6	0	1,3	9,7	8	70
252	IL4 x IL13	12	8	6	0	1,3	11,7	7	85
253	IL4 x IL13	3	6	6	2	5,1	66,8	6	66
254	IL4 x IL13	3	10	6	2	2,4	62,4	6	80
255	IL4 x IL13	3	14	6	2	2,0	72,1	2	60
256	IL4 x IL13	6	6	6	2	2,0	32,4	4	81

Lote ID	Alineación sobre HC*	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (Antígeno1) IL4 [pM]	KD (Antígeno2) IL13 [pM]
257	IL4 x IL13	6	10	6	2	1,9	29,8	7	30
258	IL4 x IL13	6	14	6	2	2,5	24,6	5	70
259	IL4 x IL13	10	6	6	2	1,4	16,4	8	71
260	IL4 x IL13	10	8	6	2	0,8	16,6	10	71
261	IL4 x IL13	12	6	6	2	1,2	12,3	5	265
262	IL4 x IL13	12	8	6	2	1,1	13,2	4	111
263	IL4 x IL13	10	6	8	0	2,4	10,8	2	74
264	IL4 x IL13	10	8	8	0	0,8	8,0	7	22
265	IL4 x IL13	12	6	8	0	1,0	9,5	8	66
266	IL4 x IL13	12	8	8	0	2,0	9,3	3	69
267	IL4 x IL13	10	6	8	2	1,4	15,0	9	170
268	IL4 x IL13	10	8	8	2	1,0	12,9	4	52
269	IL4 x IL13	12	6	8	2	1,2	8,8	5	66
270	IL4 x IL13	12	8	8	2	2,4	11,7	3	72

\* La alineación en la cadena ligera debe ser IL13V<sub>L</sub>-L<sub>1</sub>-IL4V<sub>L</sub>-L<sub>2</sub>-C<sub>L1</sub>

Los resultados de las Tablas 7 y 8 demuestran claramente que se requieren enlazadores entre los dominios variables y constantes para permitir un plegamiento óptimo. Sólo en raras disposiciones se toleró un enlazador igual a cero (véanse los Lotes de N<sup>o</sup>s de ID 103 a 105, en donde L<sub>1</sub> (LC) era cero, y el Lote N<sup>o</sup> 210, en que L<sub>4</sub> era cero). Sin embargo, en cada caso, el enlazador de transición correspondiente entre la región variable y la región constante en la otra cadena podría no ser cero.

Los resultados anteriores indicaron que las combinaciones de L<sub>1</sub> = 7, L<sub>2</sub> = 5, L<sub>3</sub> = 1 y L<sub>4</sub> = 2 eran un buen punto de partida para la optimización de un nuevo CODV-Ig en el que la cadena pesada es el molde. Los intervalos en la Tabla 9 demostraron ser intervalos razonables para la modificación por ingeniería con éxito un nuevo CODV-Ig a partir de dos anticuerpos parentales.

**Tabla 9. Intervalos de Tamaños de Enlazador para cada LC o HC como Molde**

Enlazador	LC como Molde		HC como Molde	
	Intervalo Máx.	Intervalo Mín.	Intervalo Máx.	Intervalo Mín.

Enlazador	LC como Molde		HC como Molde	
	Intervalo Máx.	Intervalo Mín.	Intervalo Máx.	Intervalo Mín.
L <sub>1</sub>	1-3	1-2	3-12	5-10
L <sub>2</sub>	1-4	1-2	3-14	5-8
L <sub>3</sub>	2-15	4-12	1-8	1-5
L <sub>4</sub>	2-15	2-12	1-3	1-2

**Ejemplo 8. Aplicabilidad Universal de Formato CODV-Ig**

5 Para evaluar la idoneidad del formato CODV-Ig para la ingeniería de nuevas proteínas de unión similares a anticuerpos de las regiones variables de numerosos anticuerpos humanos y humanizados existentes que tienen especificidad para el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R(1)), un segundo receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R(2)), receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de necrosis tumoral - alfa (TNF $\alpha$ ), interleuquinas 12 y 23 (IL-12/23) e interleuquina 1beta (IL-1 $\beta$ ) se incorporaron en el formato CODV-Ig (véase la Tabla 10).

10 **Tabla 10. Códigos Descriptivos para Cadenas Pesadas y Ligeras utilizados en CODV-Ig Biespecífico**

Código*	Cadenas Pesadas (extremos N a C)	SEQ ID NO:
HC10	IGF1R(1) V <sub>H</sub> -(Gly)-HER2 V <sub>H</sub> -(Gly2)-C <sub>H1</sub> -Fc	32
HC11	HER2 V <sub>H</sub> -(Gly)- IGF1R(1) V <sub>H</sub> -(Gly2)-C <sub>H1</sub> -Fc	33
HC12	IGF1R(2) V <sub>H</sub> -(Gly)-EGFR V <sub>H</sub> -(Gly2)-C <sub>H1</sub> -Fc	34
HC13	EGFR V <sub>H</sub> -(Gly)- IGF1R(2) V <sub>H</sub> -(Gly2)- C <sub>H1</sub> -Fc	35
HC14	TNF $\alpha$ V <sub>H</sub> -(Gly)-IL12/23 V <sub>H</sub> -(Gly2)- C <sub>H1</sub> -Fc	36
HC15	IL12/23 V <sub>H</sub> -(Gly)-TNF $\alpha$ V <sub>H</sub> -(Gly2)- C <sub>H1</sub> -Fc	37
HC16	TNF $\alpha$ V <sub>H</sub> -(Gly)-IL1 $\beta$ V <sub>H</sub> -(Gly2)-C <sub>H1</sub> -Fc	38
HC17	IL1 $\beta$ V <sub>H</sub> -(Gly)-TNF $\alpha$ V <sub>H</sub> -(Gly2)- C <sub>H1</sub> -Fc	39
Código*	Cadenas Ligeras (extremos N a C)	
LC10	HER2 V <sub>L</sub> -(Gly7)-IGF1R(1) V <sub>L</sub> -(Gly5)-C <sub>L1</sub>	40
LC11	IGF1R(1) V <sub>L</sub> -(Gly7)- HER2 V <sub>L</sub> -(Gly5)- C <sub>L1</sub>	41

## ES 2 588 306 T3

Código*	Cadenas Pesadas (extremos N a C)	SEQ ID NO:
LC12	EGFR V <sub>L</sub> -(Gly7)-IGF1R(2) V <sub>L</sub> -(Gly5)-C <sub>L1</sub>	42
LC13	IGF1R(2) V <sub>L</sub> -(Gly7)- EGFR V <sub>L</sub> -(Gly5)- C <sub>L1</sub>	43
LC14	IL12/23 V <sub>L</sub> -(Gly7)- TNF $\alpha$ V <sub>L</sub> -(Gly5)-C <sub>L1</sub>	44
LC15	TNF $\alpha$ V <sub>L</sub> -(Gly7)- IL12/23 V <sub>L</sub> -(Gly5)- C <sub>L1</sub>	45
LC16	IL1 $\beta$ V <sub>L</sub> -(Gly7)- TNF $\alpha$ V <sub>L</sub> -(Gly5)-C <sub>L1</sub>	46
LC17	TNF $\alpha$ V <sub>L</sub> -(Gly7)- IL1 $\beta$ V <sub>L</sub> -(Gly5)-C <sub>L1</sub>	47
C <sub>L1</sub>	dominio constante de la cadena ligera de C <sub>L1</sub> humano	23
C <sub>H1</sub> -Fc	dominio constante de la cadena pesada de C <sub>H1</sub> humano y región Fc	24
Gly4	enlazador peptídico con 4 glicinas (GGGG)	25
Gly5	enlazador peptídico con 5 glicinas (GGGGG)	26
Gly6	enlazador peptídico con 6 glicinas (GGGGGG)	27
Gly7	enlazador peptídico con 7 glicinas (GGGGGGG)	28
Gly8	enlazador peptídico con 8 glicinas (GGGG GGGG)	29

\* Se diseñó un código corto para representar las estructuras asociadas. Los códigos que comienzan con HC representan la cadena pesada adyacente, y los códigos que comienzan con LC representan las cadenas ligeras adyacentes

- 5 Las regiones variables de anticuerpos de anticuerpos humanos y humanizados conocidos se utilizaron para ensayar la aplicabilidad universal del formato CODV-Ig en el diseño de proteínas de unión similares a anticuerpos biespecíficos. Además, se examinó la posibilidad de efectos posicionales con respecto a la colocación de ciertas regiones variables de anticuerpo N-terminal o C-terminal en cualquiera de la cadena pesada o la cadena ligera. Basado en el diseño de moléculas de CODV-Ig que tienen una composición de enlazador L<sub>1</sub> = 7, L<sub>2</sub> = 5, L<sub>3</sub> = 1 y L<sub>4</sub> = 2, se introdujeron diferentes secuencias de anticuerpos en el formato CODV-Ig.
- 10 Las actividades de anticuerpos biespecíficos o derivados contra IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  se determinaron utilizando células informadoras HEK-Blue TNF $\alpha$ /IL1 $\beta$  disponibles comercialmente (InvivoGen). Para determinar las actividades de anticuerpos contra TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ , las citoquinas se pre-incubaron durante 1 hora con diferentes concentraciones de los anticuerpos y se añaden a 50.000 células HEK Blue TNF $\alpha$ /IL1 $\beta$ . La inducción mediada por citoquinas de SEAP se midió después de 24 horas en el sobrenadante del cultivo con el ensayo QUANTI-Blue (InvivoGen).
- 15 Tal como se muestra en la Tabla 11, todas las construcciones mostraron un buen a excelente rendimiento de proteínas y niveles aceptables de agregación (véase, en particular, Lotes de N<sup>o</sup>s de ID 301 y 302 en la Tabla 11). La afinidad medida para cada dominio variable de anticuerpo estaba dentro de la afinidad publicada o esperada. En los casos en que se evaluó la afinidad, no se detectaron efectos posicionales. En resumen, tal como se muestra en las



siguientes tablas, no se observaron efectos posicionales con ninguno de los dominios variables de anticuerpos utilizados o con el uso de estos dominios en cualquier cadena de anticuerpo.

Tabla 11. Uso Universal de Formato CODV-Ig para Proteínas de Unión similares a Anticuerpos Biespecíficas

Lote ID DC/LC Códigos <sup>1</sup>	Alineación sobre HC	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (Antígeno 1) [pM]	KD (Antígeno 2) [pM]	IC50 [pM] TNFα Celular
301 HC10/LC10	IGF1R(1) x HER2	7	5	1	2	70	5,9	n.m.	153 (HER2)	-
302 HC11/LC11	HER2 x IGF1R(1)	7	5	1	2	60	1,8	163 (HER2)	n.m.	-
303 HC12/LC12	IGF1R(2) x EGFR	7	5	1	2	17	2,7	n.m.	-	-
304 HC13/LC13	EGFR x IGF1R(2)	7	5	1	2	9,5	4,3	-	n.m.	-
305 HC14/LC14	TNFα x IL12/23	7	5	1	2	7,1	7,5	321 (TNFα)	65 (IL23)	95
306 HC15/LC15	IL12/23 x TNFα	7	5	1	2	11,9	7,1	118 (IL23)	543 (TNFα)	138
307 HC16/LC16	TNFα x IL1β	7	5	1	2	6,6	13,6	340 (TNFα)	155 (IL1β)	136
308 HC17/LC17	IL1β x TNFα	7	5	1	2	2,4	5,7	97,5 (IL1β)	358 (TNFα)	138

\*n.m.= no medibles por Biacore

<sup>1</sup> – La cadena pesada y las cadenas ligeras correspondientes a los códigos pueden encontrarse en la Tabla 10.

**Ejemplo 9. Retención de la Afinidad de Anticuerpos Parentales en Formato CODV-Ig**

Las secuencias de anticuerpos idénticas para anti-IL4 y anti-IL13 se incorporaron en los formatos TBTI/DVD-Ig o CODV-Ig para una comparación directa de estas configuraciones, el posicionamiento de los enlazadores y las afinidades de las moléculas resultantes. Como se muestra en la Figura 7, la afinidad de los parentales de cada uno de los anticuerpos se mantuvo en el formato CODV. Tal como se muestra en el panel superior de la Figura 7, cuando las regiones variables se colocaron en el formato TBTI/DVD-Ig, un descenso en la afinidad del anticuerpo IL4 colocado en la posición interior de Fv2 se manifestó como una reducción de la tasa en enlace de la unión del anticuerpo al antígeno. En contraposición, no hubo pérdida en la afinidad para el formato CODV-Ig, en comparación con los anticuerpos parentales (véase la Figura 7, Panel inferior).

**10 Ejemplo 10. Adaptabilidad de CODV-Ig al Formato de Fab**

Se evaluó seguidamente la capacidad del formato CODV-Ig de proporcionar fragmentos tales como fragmentos Fab. Dos cadenas pesadas variables diferentes se fusionaron entre sí a través del enlazador L<sub>3</sub> y fueron alargadas en posición C-terminal por el enlazador L<sub>4</sub>. Este complejo V<sub>H</sub> se fusionó entonces al dominio C<sub>H1</sub> de IGHG1 (GenBank N° de Acceso Q569F4) que alberga en posición C-terminal las cinco secuencias de aminoácidos DKTHT (SEQ ID NO: 60) de la región de bisagra seguidas de seis residuos histidina. Dos cadenas ligeras variables diferentes se fusionaron entre sí en una configuración de entrecruzamiento a la cadena pesada correspondiente a través del enlazador L<sub>1</sub> y fueron extendidas en posición C-terminal por el enlazador L<sub>2</sub> y posteriormente fueron fusionadas a la cadena kappa constante (IGKC, GenBank N° de Acceso Q502W4).

Los fragmentos Fab se expresaron mediante transfección transitoria tal como se ha descrito anteriormente. Siete días después de la transfección, las células se separaron por centrifugación, se añadió Tris-HCl 1M al 10% v/v, pH 8,0 y el sobrenadante se hizo pasar por un filtro de 0,22 µm para separar las partículas. Las proteínas Fab fueron capturadas utilizando columnas de alto rendimiento Histrap (GE Healthcare) y fueron eluidas a través de gradiente de imidazol. Las fracciones que contienen proteínas se reunieron y se desalaron utilizando columnas PD-10 o Sephadex. Disoluciones de proteínas concentradas y filtradas en condiciones estériles (0,22 µm) se ajustaron a 1 mg/ml y se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

Se observaron ventajas inmediatas debido a que las moléculas de tipo Fab en una orientación CODV no mostraron tendencia a agregarse y conservaron las afinidades de los anticuerpos parentales (véase la Tabla 12). Construcciones de proteínas de unión de los Lotes de N°s de ID. 401-421 compararon directamente proteínas similares a anticuerpos en las que las regiones variables de anticuerpos se dispusieron como en moléculas CODV-Ig con la cadena pesada como molde (401, 402, 406, y 407), fragmentos similares a Fab CODV (402, 408, 413, 418 y 421), moléculas de cuatro dominios similares a anticuerpos en formato TBTI/DVD-Ig (404, 409, 414 y 419) y CODV-Ig sin enlazadores (405, 410, 415 y 420). Tal como se muestra en la Tabla 12, los resultados de esta comparación indicaron que hay más probabilidades de haber una pérdida en la afinidad en comparación con los anticuerpos parentales cuando la región variable se incorpora en un formato TBTI o DVD-Ig. Por el contrario, tanto el formato CODV-Ig como el formato CODV-Ig similares a Fab eran más capaces de mantener las afinidades de los parentales. Los resultados confirmaron, además, que moléculas de Ig-CODV requieren enlazadores entre las regiones variables y entre las regiones variables y los dominios constantes (véase la Tabla 12).

Tabla 12. Uso del Formato CODV-Ig para Fragmentos similares a Fab

Lote ID	Muestra-ID	Formato	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (Antígeno 1) [pM]	KD (Antígeno 2) [pM]	IC50 [pM] TNFα Ensayo Celular
401	TNFα x IL12/23	CODV-Ig	7	5	1	2	7,1	7,5	321 (TNFα)	90 (IL23)	95
402	IL12/23 x TNFα	CODV-Ig	7	5	1	2	11,9	7,1	118 (IL23)	543 (TNFα)	138
403	TNFα x IL12/23	CODV-Fab	7	5	1	2	18,7	1,7	232 (TNFα)	41 (IL23)	785
404	TNFα x IL12/23	TBTI	(G4S)2	0	(G4S)2	0	26,0	8,7	219 (TNFα)	399 (IL23)	-
405	TNFα x IL12/23	CODV-Ig	0	0	0	0	3,5	71	-	-	-
406	IL1β x TNFα	CODV-Ig	7	5	1	2	2,4	5,7	98 (IL1β)	358 (TNFα)	139
407	TNFα x IL1β	CODV-Ig	7	5	1	2	6,6	13,6	340 (TNFα)	155 (IL1β)	122
408	IL1β x TNFα	CODV-Fab	7	5	1	2	8,6	0	179 (IL1β)	-	-
409	IL1β x TNFα	TBTI	(G4S)2	0	(G4S)2	0	1,3	40,5	133 (IL1β)	456 (TNFα)	-
410	TNFα x IL1β	CODV-Ig	0	0	0	0	n.p.	-	-	-	-
411	EGFR x IGF1R(2)	CODV-Ig	7	5	1	2	9,5	4,3	124nM (EGFR)	n.m.	-
412	IGF1R(2) x EGFR	CODV-Ig	7	5	1	2	17	2,7	n.m.	-	-
413	EGFR x IGF1R(2)	CODV-Fab	7	5	1	2	13,3	0	42nM (EGFR)	n.m.	-
414	EGFR x IGF1R(2)	TBTI	(G4S)2	0	(G4S)2	0	2,1	2,9	7nM (EGFR)	n.m.	-
415	EGFR x IGF1R(2)	CODV-Ig	0	0	0	0	4,4	100	-	-	-
416	HER2 x IGF1R(1)	CODV-Ig	7	5	1	2	60,0	1,8	163 (HER2)	n.m.	-
417	IGF1R(1) x HER2	CODV-Ig	7	5	1	2	70	5,9	n.m.	41 (HER2)	-
418	HER2 x	CODV-Fab	7	5	1	2	34,4	0	190 (HER2)	n.m.	-

Lote ID	Muestra-ID	Formato	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (Antígeno no 1) [pM]	KD (Antígeno no 2) [pM]	IC50 [pM] TNFα Ensayo Celular
	IGF1R(1)										
419	HER2 x IGF1R(1)	TBTI	(G4S)2	0	(G4S)2	0	6,3	6,8	56 (HER2)	n.m.	-
420	IGF1R(1) x HER2	CODV-Ig	0	0	0	0	0,35	54,5	-	-	-
421	IL4 x IL13	CODV-Fab	7	5	1	2	8,7	14	12 (IL4)	48 (IL13)	-

**Ejemplo 11. Sustitución de los Dominios Variables dentro de CODV-Ig y CODV-Fab**

Para caracterizar el formato CODV en un enfoque de acoplamiento de células T, se generaron proteínas de unión similares a CODV Fab biespecíficas (CODV-Fab) que tienen un sitio de unión TCR (CD3epsilon) y un sitio de unión a CD19 y se compararon con un Fab biespecífico derivado del formato TBTI/DVD-Ig (B-Fab). Para investigar la importancia de la orientación de los sitios de unión (TCR x CD19 frente a CD19 x TCR), se evaluaron ambas orientaciones para cada una de las proteínas de unión.

Las proteínas de unión se caracterizaron en un ensayo citotóxico utilizando células NALM-6 (que expresan CD 19) como células diana y células T primarias humanas como células efectoras. Células CD3 positivas se aislaron de PBMCs humanas recién preparadas. Las células efectoras y diana se mezclaron en una proporción de 10:1 y se incubaron durante 20 horas con las concentraciones indicadas de las proteínas de unión biespecíficas (véase la Figura 8). Se determinaron las células diana apoptóticas en un ensayo basado en FACS utilizando tinción con 7-aminoactinomicina.

El formato B-Fab en la configuración CD3-CD19 (1060) demostró ser activo para inducir la citotoxicidad mediada por células T hacia células NALM-6 con una CE50 de 3,7 ng/ml. Se observó una actividad similarmente alta para el CD19-CD3 CODV-Fab (1109) con una EC50 de 3,2 ng/ml (véase la Figura 8).

Una permuta de la configuración de la molécula de B-Fab (Fab del formato TBTI/DVD-Ig) a una orientación CD19-CD3 resultó en una pérdida significativa de la actividad (véase la Figura 8). La molécula de B-Fab permutada no mostró actividad a concentraciones que eran máximas para ambas orientaciones de CODV-Ig Fab y la otra orientación de B-Fab. Para los CODV-Ig Fabs y una orientación de B-Fab, se observó una respuesta máxima (que oscila entre 1 y 100 ng/ml). Para la orientación CD19-CD3 de B-Fab, incluso a la concentración máxima (30 µg/ml), no se alcanzó la respuesta óptima citotóxica. En contraste nítido, un cambio en la orientación de los dominios en el CODV-Fab hacia CD3-CD19 (1108) dio como resultado una molécula con actividad significativa en este ensayo (véase la Figura 8). Aunque la permuta del dominio en el CODV-Fab también redujo la inducción de la citotoxicidad mediada por células T (aumento de EC50 en un factor de ~ 100), este efecto fue mucho menos pronunciado que el que se vio en el formato B-Fab y la molécula fue capaz de inducir citotoxicidad hasta el nivel máximo. Los datos eran representativos y se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes.

**Ejemplo 12. Influencia de la Identidad de la Secuencia de Aminoácidos en Enlazadores de CODV-Ig**

La construcción optimizada correspondiente al Lote ID 204 (véase el Ejemplo 7 y la Tabla 8) fue elegida para investigar la influencia de la composición de enlazador en los enlazadores L<sub>1</sub> a L<sub>4</sub>. Las longitudes de enlazador se ajustaron a 7, 5, 1 y 2 residuos de longitud para L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub>, respectivamente (véase la Tabla 13). Las secuencias de ensayo se derivaron de enlazadores que se producen de forma natural en las transiciones entre los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H1</sub> de anticuerpos naturales o entre los dominios F<sub>v</sub> y C<sub>L</sub> de anticuerpo de cadenas ligeras kappa o lambda. Las secuencias candidatas eran ASTKGPS (SEQ ID NO: 48), que se deriva de la transición de los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H1</sub>, RTVAAPS (SEQ ID NO: 49) y GQPKAAP (SEQ ID NO: 50), que se derivaron de las transiciones de los dominios F<sub>v</sub> y C<sub>L</sub> de cadenas ligeras kappa y lambda, respectivamente. Además, se generó una construcción con una composición arbitraria de enlazador para demostrar que potencialmente se puede utilizar cualquier secuencia en los enlazadores L<sub>1</sub> a L<sub>4</sub>. Esta composición de enlazador se obtuvo mediante la distribución al azar de los aminoácidos valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, glicina y prolina en las 15 posiciones de los cuatro enlazadores. Los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, así como los aminoácidos metionina y cisteína fueron excluidos deliberadamente para evitar potenciales aumentos en la agregación.

Un modelo tridimensional de la construcción para el Lote ID No. 204 fue generado para asegurar la idoneidad o refinar las opciones de composición de enlazador. Por lo tanto, serina fue elegido para el enlazador L<sub>3</sub>, ya que se observan residuos cargados positiva y negativamente en las intermediaciones del modelo tridimensional. Los residuos en el enlazador L<sub>4</sub> fueron seleccionados para que fuesen compatibles con la exposición a disolventes de estas posiciones tal como se sugiere por el modelo. Del mismo modo, no se anticiparon o pronosticaron problemas para las composiciones de enlazador de L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>. Se construyeron modelos tridimensionales de las propuestas seleccionadas para la composición de enlazador.

Tal como se muestra en la Tabla 12, la composición de enlazador puede tener una influencia drástica en el rendimiento. Las secuencias que se derivaron de la cadena lambda en L<sub>1</sub> (comparando los Lotes de N°s de ID 505 a 507 con Lotes de N°s de ID 501 a 503) eran los generadores de proteínas más productivos (hasta 8 veces mayor). De hecho, los enlazadores basados en la generación aleatoria también producen buenos rendimientos, tal como se muestra en la Tabla 13, Lote de N° de ID 508. Por lo tanto, la composición de enlazador debe ser un parámetro considerado durante la optimización de CODV-Ig.

Tabla 13. Efecto de la Composición del Enlazador sobre CODV-Ig

Lote ID	Alineación sobre HC	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (IL4) [pM]	KD (IL13) [pM]	IC50 Ensayo Celular IL4 [nM]	IC50 Ensayo Celular IL13 [nM]
501	IL4 x IL13	ASTKGPS (SEQ ID NO: 48)	TKGPS (SEQ ID NO: 52)	S	RT	10,8	1,2	1	55	0,034	4,5
502	IL4 x IL13	ASTKGPS (SEQ ID NO: 48)	TVAAP (SEQ ID NO: 53)	S	QP	15,8	2,9	3	61	0,049	2,4
503	IL4 x IL13	ASTKGPS (SEQ ID NO: 48)	TVAAP (SEQ ID NO: 53)	S	SS	11,6	3,5	3	52	0,047	2,1
504	IL4 x IL13	RTVAAPS (SEQ ID NO: 49)	QPKAA (SEQ ID NO: 54)	S	TK	15	1,9	8	71	0,042	1,4
505	IL4 x IL13	GQPKAAP (SEQ ID NO: 50)	TKGPS (SEQ ID NO: 52)	S	RT	71,7	1,9	6	68	0,033	0,9
506	IL4 x IL13	GQPKAAP (SEQ ID NO: 50)	TVAAP (SEQ ID NO: 53)	S	TK	49,3	1,7	7	55	0,045	1,8
507	IL4 x IL13	GQPKAAP (SEQ ID NO: 50)	QPKAA (SEQ ID NO: 54)	S	RT	62,4	2	1	69	0,040	2,0
508	IL4 x IL13	HIDSPNK (SEQ ID NO: 51)	QRIEG (SEQ ID NO: 55)	V	SL	37,7	2,1	1	44	0,054	1,3

Las actividades de anticuerpos biespecíficos o derivados contra citoquinas IL4 e IL13 se determinaron en células informadoras HEK-Blue IL-4/IL-13 disponibles comercialmente (InvivoGen). Las células HEK-Blue IL-4/IL-13 están diseñadas para controlar la activación de la vía STAT6 por IL-4 o IL13. La estimulación de las células con cualquiera de las citoquinas resulta en la producción del gen informador fosfatasa alcalina secretada embrionaria (SEAP), que puede medirse en el sobrenadante del cultivo con el ensayo QUANTI-Blue. Para testar las actividades de anticuerpos contra IL4 o IL13, las citoquinas se pre-incubaron durante 1 hora con diferentes concentraciones de los anticuerpos y se añadieron a 50.000 células HEK-Blue IL-4/IL-13. La inducción de SEAP mediada por citoquinas se midió después de 24 horas de incubación en el sobrenadante de cultivo de células con el ensayo QUANTI-Blue (InvivoGen).

### 10 **Ejemplo 13. Introducción de Cisteínas en Enlazadores de CODV-Ig**

Los datos publicados sugieren que la estabilidad de los anticuerpos y proteínas derivadas de anticuerpos se puede aumentar mediante la introducción de puentes disulfuro no naturales (véase Wozniak-Knopp *et al.*, 2012, "Stabilisation of the Fc Fragment of Human IgG1 by Engineered Intradomain Disulfide Bonds," *PLoS ONE* 7(1): e30083). Para examinar si el fragmento Fc equivalente derivado de un anticuerpo IgG1 humano y modificado por ingeniería genética en una molécula de CODV-Ig se puede estabilizar por la introducción de puentes disulfuro intere intra-cadena, las posiciones de Fc equivalentes de la construcción de CODV-Ig Lote de N° de ID 204 (del Ejemplo 7) se mutaron a residuos cisteína, y las proteínas mutantes se produjeron en exceso, se purificaron y se caracterizaron (véase la Tabla 14).

Tal como se muestra en la Tabla 14, cada una de las moléculas de CODV-Ig mutadas que contienen residuos cisteína adicionales tenían temperaturas de fusión que eran la misma que la temperatura de fusión para la construcción de CODV-Ig Lote de N° de ID 204.

Además, dos cisteínas simultáneas se introdujeron en las posiciones Kabat 100 para la cadena ligera y 44 para la cadena pesada en cada uno de los dominios variables tal como se describe en Brinkmann *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 7538-42. Estas posiciones han demostrado estar conservadas estructuralmente dentro de los pliegues de anticuerpos y, por lo tanto, son tolerables de la sustitución de cisteínas sin interferir en la integridad de los dominios individuales.

Tal como se muestra en la Tabla 15, construcciones de CODV y CODV-Ig en las que se introdujeron residuos cisteína en las posiciones Kabat 100 para la cadena ligera y 44 para la cadena pesada en cada uno de los dominios variables tenían temperaturas de fusión más altas que las construcciones de CODV y CODV-Ig, en las que los residuos cisteína no se introdujeron en estas posiciones (véase, p. ej., Lote de N°s de ID 704 y 706 y Lote de N°s de ID 713 y 714).

### 1. **Mediciones de Termoestabilidad de Variantes de CODV y TBTI**

Los puntos de fusión (T<sub>m</sub>) de variantes de CODV y TBTI se determinaron utilizando fluorimetría de exploración diferencial (DSF). Las muestras se diluyeron en tampón D-PBS (Invitrogen) a una concentración final de 0,2 µg/µl y se añadieron a 2 µl de una disolución concentrada 40x de colorante SYPRO-Orange (Invitrogen) en D-PBS en placas de 96 pocillos con semi-faldón blancas. Todas las mediciones se realizaron por duplicado utilizando un instrumento de PCR en tiempo real MyiQ2 (Biorad). Los valores de T<sub>m</sub> fueron extraídos de la primera derivada negativa de las curvas de fusión utilizando el Software iQ5 v2.1.

A continuación, se examinó el efecto de introducir residuos cisteína directamente en los enlazadores o dentro de la región variable. En este ejemplo, el Lote de N° de ID 204 (del Ejemplo 7 y la Tabla 8) se utilizó como proteína de unión CODV-Ig modelo, y la cisteína fue sustituida por glicina en L<sub>1</sub>, L<sub>3</sub>, o la región variable sobre la base del modelo tridimensional. Tal como se muestra en la Tabla 16 que figura más adelante, los resultados indican cómo la introducción de pares de cisteína afectaría al rendimiento y a la agregación. Las mutaciones previstas fueron modeladas para comprobar si los enlaces disulfuro se formaron correctamente y la geometría correcta se mantuvo para los enlazadores y su entorno en los modelos. No obstante, el Lote de N° de ID 808 mostró un buen rendimiento y poca agregación, lo que sugiere que se podría formar un puente cisteína adecuada.

Cada una de las realizaciones descritas en esta memoria se puede combinar con cualquier otra realización o realizaciones, a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica o realización indicada como preferida o ventajosa se pueden combinar con cualquier otra característica o características o realización o realizaciones indicadas como preferentes o ventajosas, salvo que se indique claramente lo contrario.



Tabla 14. Efecto de la Estabilización del Puente Disulfuro sobre CODV-Ig

Lote ID	Alineación sobre HC	Mutaciones Introducidas IGHG1	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (IL4) [pM]	KD (IL13) [pM]	IC50 Ensayo Celular IL4 [nM]	IC50 Ensayo Celular IL13 [nM]	Tm [°C]
601	IL4 x IL13	P344C & A432C	7	5	1	2	21,6	0,9	n.d.	n.d.	0,032	1,7	64
602	IL4 x IL13	S376C & P397C	7	5	1	2	13,9	0,8	10	100	0,034	1,5	64
603	IL4 x IL13	P446G447 to G446E447C448	7	5	1	2	15,7	1,3	4	64	0,036	1,4	64

Tabla 15. Efecto de la Estabilización del Puente Disulfuro sobre CODV-Ig

Lote ID	Alineación sobre HC	Forma-to	Mutaciones Introducidas LC	Mutaciones Introducidas HC	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (Antígeno 1) [pM]	KD (Antígeno 2) [pM]	Tm [°C]
704	IL13 x IL4	CODV	-	-	7	5	1	2	15,3	5,2	3	25	64
706	IL4 x IL13	CODV	G100C & G100C	G44C & G44C	7	5	1	2	3,2	17,7	8	61	68
713	IGF1R(1) x HER2	CODV-Ig	-	-	7	5	1	2	60	1,8	163 (HER2)	-	64
714	IGF1R(1) x HER2	CODV-Ig	G100C & Q100C	G44C & G44C	7	5	1	2	3,4	7,9	362 (HER2)	-	68

Tabla 16A. Efecto de la Estabilización del Puente Disulfuro sobre CODV-Ig

Lote ID	Alineación sobre HC	Mutaciones Introducidas LC	Mutaciones Introducidas HC	L1	L2	L3	L4	Rendimiento [mg/L]	Agregación [%]	KD (IL4) [pM]	KD (IL13) [pM]	Tm
801	IL4 x IL13			7	5	1	2	15,3	5,2	3	25	64
802	IL4 x IL13	G 114C	Q43C	GGCGGG (SEQ ID NO: 56)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	3,0	11,3	6	34	64
803	IL4 x IL13	G115C	Q43C	GGCGGG (SEQ ID NO: 57)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	4,0	9,4	6	20	63
804	IL4 x IL13	G116C	Q43C	GGGCGG (SEQ ID NO: 58)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	11,1	9,6	2	33	64
805	IL4 x IL13	G117C	Q43C	GGGCGG (SEQ ID NO: 59)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	5,8	10,6	7	45	64
806	IL4 x IL13	S60C	S122C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	n.p.	-	-	-	-
807	IL4 x IL13	S60C	S123C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	7,5	27,9	2	202	66
808	IL4 x IL13	S60C	G124C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	C	GG	1,1	5,8	5	70	64
809	IL4 x IL13	G61C	S122C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	8,7	6,9	6	81	65

Tabla 16B. Efecto de la Estabilización del Puente Disulfuro sobre CODV-Ig

Lote ID	Alineación sobre HC	Mutaciones Introducidas LC	Mutaciones Introducidas HC	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	IC50 Ensayo Celular IL4 [nM]	IC50 Ensayo Celular IL13 [nM]
801	IL4 x IL13			7	5	1	2	0,045	1,8
802	IL4 x IL13	G114C	Q43C	GGGGGG (SEQ ID NO: 56)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0,027	1,2
803	IL4 x IL13	G115C	Q43C	GGGGGG (SEQ ID NO: 57)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0,036	1,5
804	IL4 x IL13	G116C	Q43C	GGGGGG (SEQ ID NO: 58)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0,040	1,8
805	IL4 x IL13	G117C	Q43C	GGGGGG (SEQ ID NO: 59)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0,047	1,9
806	IL4 x IL13	S60C	S122C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	-	-
807	IL4 x IL13	S60C	S123C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0,048	10,1
808	IL4 x IL13	S60C	G124C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	C	GG	0,023	3,8
809	IL4 x IL13	G61C	S122C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0,035	2,8

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> Rao, Ercole  
Mikol, Vincent  
Corvey, Carsten
- 5 Beil, Christian  
Lange, Christian  
Steinmetz, Anke  
Baurin, Nicolas
- 10 Li, Danxi
  
- <120> Proteínas de unión similares a anticuerpos con regiones variables duales con una orientación de entrecruzamiento de la región de unión
  
- <130> US2011/026
- 15 <140> TBD  
<141> 11-03-2011
  
- <160> 59
  
- <170> PatentIn version 3.5
- 20 <210> 1  
<211> 108  
<212> PRT
  
- 25 <213> Secuencia Artificial
  
- <220>  
< 223> Cadena ligera (VL) humanizada de anticuerpo anti-IL4
- 30 <400> 1
  
- Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly  
1 5 10 15
  
- Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp  
20 25 30
  
- Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45
  
- Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60
  
- Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80
  
- Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe  
85 90 95
  
- Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105
- <210> 2  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial
- 35

ES 2 588 306 T3

<220>

< 223> Región V de la cadena pesada (VH) humanizada de anticuerpo anti-IL4

<400> 2

```

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
          20          25          30

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
          50          55          60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
          100          105          110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
          115          120

```

- 5 <210> 3
- <211> 111
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

10 < 223> Región V de la cadena ligera (VL) humanizada de un anticuerpo anti-IL13

<400> 3

```

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

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

Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
          35          40          45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

```

ES 2 588 306 T3

50

55

60

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

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala  
85 90 95

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

<210> 4

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región V de la cadena pesada (VL) humanizada de un anticuerpo anti-IL13

<400> 4

10

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser  
20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 5

<211> 575

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción de doble cabeza de cruzamiento pesada IL13(G4S)IL4CHFc

<400> 5

ES 2 588 306 T3

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

ES 2 588 306 T3

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 245 250 255  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 260 265 270  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 275 280 285  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 290 295 300  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 325 330 335  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 340 345 350  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 355 360 365  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 370 375 380  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 385 390 395 400  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 405 410 415  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 420 425 430  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 435 440 445  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 450 455 460  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 465 470 475 480  
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 485 490 495



ES 2 588 306 T3

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 500 505 510

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 515 520 525

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 530 535 540

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 545 550 555 560

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 565 570 575

<210> 6

<211> 580

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción de doble cabeza de entrecruzamiento pesada IL13(G4S2)IL4CHFc

<400> 6

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser  
 20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125

10

ES 2 588 306 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 130 135 140

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

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 165 170 175

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe  
 180 185 190

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 195 200 205

Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 210 215 220

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val  
 225 230 235 240

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 260 265 270

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 275 280 285

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 290 295 300

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 305 310 315 320

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 325 330 335

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 340 345 350

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 355 360 365

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 370 375 380

ES 2 588 306 T3

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
385 390 395 400

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
405 410 415

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
420 425 430

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
435 440 445

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
450 455 460

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
465 470 475 480

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
485 490 495

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
500 505 510

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
515 520 525

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
530 535 540

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
545 550 555 560

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
565 570 575

Leu Ser Pro Gly  
580

<210> 7

<211> 698

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción de doble cabeza de cruzamiento pesada IL4(G4S)IL13CHFc

<400> 7

ES 2 588 306 T3

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly  
 130 135 140

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser  
 145 150 155 160

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 165 170 175

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys  
 180 185 190

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 195 200 205

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 210 215 220

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
 225 230 235 240

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

ES 2 588 306 T3

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 260 265 270  
 Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly  
 275 280 285  
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr  
 290 295 300  
 Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu  
 305 310 315 320  
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser Glu Asp  
 325 330 335  
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp  
 340 345 350  
 Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 355 360 365  
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
 370 375 380  
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
 385 390 395 400  
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
 405 410 415  
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
 420 425 430  
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
 435 440 445  
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
 450 455 460  
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 465 470 475 480  
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 485 490 495  
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

ES 2 588 306 T3

500 505 510

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
515 520 525

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
530 535 540

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
545 550 555 560

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
565 570 575

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
580 585 590

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
595 600 605

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
610 615 620

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
625 630 635 640

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
645 650 655

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
660 665 670

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
675 680 685

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
690 695

<210> 8

<211> 703

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción de doble cabeza de entrecruzamiento pesada IL4(G4S2)IL13CHFc

<400> 8

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

ES 2 588 306 T3

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
 130 135 140

Val Ala Pro Gly Gly Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe  
 145 150 155 160

Ser Leu Thr Asp Ser Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 165 170 175

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr  
 180 185 190

Ala Asp Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys  
 195 200 205

Ser Gln Val Phe Leu Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala  
 210 215 220

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe  
 225 230 235 240

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gln Val Gln Leu Gln  
 245 250 255

Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser

ES 2 588 306 T3

	260		265		270														
Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	His	Trp	Ile				
		275					280					285							
Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Met	Ile	Asp	Pro				
	290					295					300								
Ser	Asp	Gly	Glu	Thr	Arg	Leu	Asn	Gln	Arg	Phe	Gln	Gly	Arg	Ala	Thr				
305					310					315					320				
Leu	Thr	Val	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Arg	Ser				
				325					330						335				
Pro	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Leu	Lys	Glu				
			340					345						350					
Tyr	Gly	Asn	Tyr	Asp	Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr				
		355					360					365							
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro				
	370					375					380								
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly				
385					390					395					400				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn				
				405					410						415				
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln				
			420					425						430					
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser				
		435					440						445						
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser				
	450					455					460								
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr				
465					470					475					480				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser				
				485					490						495				
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg				
			500					505						510					



ES 2 588 306 T3

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
515 520 525

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
530 535 540

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
545 550 555 560

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
565 570 575

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
580 585 590

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
595 600 605

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
610 615 620

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
625 630 635 640

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
645 650 655

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
660 665 670

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
675 680 685

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
690 695 700

<210> 9

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Construcción de doble cabeza de entrecruzamiento ligera IL13(G4S)IL4CL

<400> 9

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

10 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr

ES 2 588 306 T3

			20						25							30	
Gly	Gln	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ala	Gly	Gln	Pro	Pro		
		35					40					45					
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala		
	50					55					60						
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp		
65					70					75					80		
Pro	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Ala		
				85					90					95			
Glu	Asp	Ser	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly		
			100					105					110				
Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser		
		115					120					125					
Val	Ser	Val	Gly	Asp	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Cys	His	Ala	Ser	Gln	Asn		
	130					135					140						
Ile	Asp	Val	Trp	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Asn	Ile	Pro		
145					150					155					160		
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Ala	Ser	Asn	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser		
				165					170					175			
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser		
			180					185						190			
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala	His		
		195					200					205					
Ser	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg		
	210					215					220						
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln		
225					230					235					240		
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr		
				245					250					255			
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser		
		260						265					270				

ES 2 588 306 T3

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 275 280 285

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 290 295 300

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 305 310 315 320

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 325 330

<210> 10

<211> 335

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción de doble cabeza de entrecruzamiento ligera IL13(G4S2)IL4CL

<400> 10

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

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

Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 50 55 60

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

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala  
 85 90 95

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser  
 115 120 125

Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys  
 130 135 140

10 His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys



ES 2 588 306 T3

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110  
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 115 120 125  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr  
 130 135 140  
 Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 165 170 175  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp  
 180 185 190  
 Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala  
 195 200 205  
 Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 210 215 220  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 225 230 235 240  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 260 265 270  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

ES 2 588 306 T3

275	280	285																				
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys							
290						295						300										
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro							
305					310						315											
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys													
				325						330												

<210> 12

<211> 335

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción de doble cabeza de entrecruzamiento ligera IL4(G4S2)IL13CL

<400> 12

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Val	Gly					
1				5						10				15						
Asp	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Cys	His	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Asp	Val	Trp					
			20						25				30							
Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Asn	Ile	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile					
			35						40				45							
Tyr	Lys	Ala	Ser	Asn	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly					
		50						55				60								
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro					
65					70						75				80					
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala	His	Ser	Tyr	Pro	Phe					
				85						90				95						
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser					
			100						105				110							
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu					
		115						120				125								
Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu					
		130						135				140								
Ser	Val	Asp	Ser	Tyr	Gly	Gln	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys					
145					150						155				160					

10

ES 2 588 306 T3

Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu  
 165 170 175

Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe  
 180 185 190

Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr  
 195 200 205

Cys Gln Gln Asn Ala Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 210 215 220

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
 225 230 235 240

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
 245 250 255

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
 260 265 270

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp  
 275 280 285

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys  
 290 295 300

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln  
 305 310 315 320

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 325 330 335

<210> 13

<211> 583

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena pesada para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código HC1

<400> 13

10

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser  
 20 25 30

ES 2 588 306 T3

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu  
115 120 125

Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile  
130 135 140

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp  
145 150 155 160

Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp  
165 170 175

Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala  
180 185 190

Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg  
195 200 205

Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys  
210 215 220

Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly  
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser  
245 250 255

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
260 265 270

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
275 280 285



ES 2 588 306 T3

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 290 295 300

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
 305 310 315 320

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
 325 330 335

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
 340 345 350

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 355 360 365

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 370 375 380

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 385 390 395 400

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 405 410 415

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 420 425 430

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 435 440 445

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 450 455 460

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 465 470 475 480

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
 485 490 495

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 500 505 510

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 515 520 525

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

ES 2 588 306 T3

530

535

540

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
545 550 555 560

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
565 570 575

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
580

<210> 14

<211> 580

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena pesada para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código HC2

<400> 14

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser  
20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu  
115 120 125

Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile  
130 135 140

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp  
145 150 155 160

10

ES 2 588 306 T3

Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp  
 165 170 175

Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala  
 180 185 190

Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg  
 195 200 205

Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys  
 210 215 220

Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly  
 225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly  
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 260 265 270

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 275 280 285

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 290 295 300

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 305 310 315 320

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 325 330 335

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 340 345 350

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 355 360 365

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 370 375 380

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 385 390 395 400

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

ES 2 588 306 T3

405 410 415

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
420 425 430

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
435 440 445

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
450 455 460

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
465 470 475 480

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
485 490 495

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
500 505 510

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
515 520 525

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
530 535 540

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
545 550 555 560

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
565 570 575

Leu Ser Pro Gly  
580

<210> 15

<211> 579

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena pesada para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código HC3

<400> 15

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser  
20 25 30

10

ES 2 588 306 T3

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly  
 115 120 125

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala  
 130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg  
 145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly  
 165 170 175

Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val  
 180 185 190

Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser  
 195 200 205

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn  
 210 215 220

Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr  
 225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 245 250 255

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 260 265 270

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

ES 2 588 306 T3

275	280	285																		
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro					
290						295					300									
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr					
305					310					315					320					
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn					
				325					330					335						
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser					
			340					345					350							
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu					
		355					360					365								
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu					
	370					375					380									
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser					
385					390					395					400					
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu					
				405					410					415						
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr					
			420					425					430							
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn					
		435					440					445								
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro					
	450					455					460									
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln					
465					470					475					480					
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val					
				485					490					495						
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val					
			500					505					510							
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro					
		515					520					525								

ES 2 588 306 T3

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 530 535 540

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 545 550 555 560

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 565 570 575

Ser Pro Gly

<210> 16

<211> 576

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia de la cadena pesada para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código HC4

<400> 16

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser  
 20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly  
 115 120 125

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala  
 130 135 140

10 Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg





ES 2 588 306 T3

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
420 425 430

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
435 440 445

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
450 455 460

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
465 470 475 480

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
485 490 495

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
500 505 510

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
515 520 525

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
530 535 540

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
545 550 555 560

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
565 570 575

<210> 17

<211> 581

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena pesada para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código HC5

<400> 17

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser  
20 25 30

10 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

ES 2 588 306 T3

	35					40						45					
Gly	Met	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Arg	Ile	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ala	Leu	Lys		
	50					55					60						
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Ser	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu		
	65				70					75					80		
Glu	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala		
				85					90					95			
Arg	Asp	Gly	Tyr	Phe	Pro	Tyr	Ala	Met	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
			100					105					110				
Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln		
		115					120					125					
Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys		
	130					135					140						
Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	His	Trp	Ile	Lys		
	145				150					155					160		
Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Met	Ile	Asp	Pro	Ser		
				165					170					175			
Asp	Gly	Glu	Thr	Arg	Leu	Asn	Gln	Arg	Phe	Gln	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu		
			180					185					190				
Thr	Val	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Arg	Ser	Pro		
		195					200					205					
Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Leu	Lys	Glu	Tyr		
	210					215					220						
Gly	Asn	Tyr	Asp	Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Leu		
	225				230					235					240		
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Thr	Lys		
				245					250					255			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
			260					265					270				
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
		275					280					285					

ES 2 588 306 T3

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 290 295 300

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 305 310 315 320

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 325 330 335

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 340 345 350

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 355 360 365

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 370 375 380

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 385 390 395 400

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 405 410 415

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 420 425 430

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 435 440 445

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 450 455 460

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 465 470 475 480

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 485 490 495

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 500 505 510

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 515 520 525

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 530 535 540

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 545 550 555 560

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 565 570 575

Ser Leu Ser Pro Gly  
 580

ES 2 588 306 T3

<210> 18  
 <211> 578  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Cadena pesada para V-Ig dual de cruzamiento con el código HC6

<400> 18

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln  
 115 120 125  
 Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys  
 130 135 140  
 Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys  
 145 150 155 160

10

ES 2 588 306 T3

Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser  
 165 170 175

Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu  
 180 185 190

Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Pro  
 195 200 205

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu Tyr  
 210 215 220

Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Leu  
 225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 245 250 255

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 260 265 270

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 275 280 285

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 290 295 300

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 305 310 315 320

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 325 330 335

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 340 345 350

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 355 360 365

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 370 375 380

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 385 390 395 400

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 405 410 415

ES 2 588 306 T3

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 420 425 430

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 435 440 445

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 450 455 460

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 465 470 475 480

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 485 490 495

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 500 505 510

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 515 520 525

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 530 535 540

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 545 550 555 560

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 565 570 575

Pro Gly

<210> 19

<211> 328

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena ligera para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código LC1

<400> 19

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

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp  
 20 25 30

10

ES 2 588 306 T3

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Asp Ile  
 100 105 110  
 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg  
 115 120 125  
 Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln  
 130 135 140  
 Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe  
 165 170 175  
 Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val  
 180 185 190  
 Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala Glu Asp  
 195 200 205  
 Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val  
 210 215 220  
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
 245 250 255  
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
 260 265 270  
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
 275 280 285  
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 290 295 300  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
 305 310 315 320  
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 325

ES 2 588 306 T3

<210> 20  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia de la cadena ligera para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código LC2  
 <400> 20

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

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp  
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Asp Ile Val Leu  
 100 105 110

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr  
 115 120 125

Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Tyr  
 130 135 140

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 145 150 155 160



ES 2 588 306 T3

Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 165 170 175

Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Gln Ala  
 180 185 190

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala Glu Asp Ser Arg  
 195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 210 215 220

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 225 230 235 240

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 245 250 255

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 260 265 270

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 275 280 285

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 290 295 300

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 305 310 315 320

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 325

<210> 21

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena ligera para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código LC3

<400> 21

10

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

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp  
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile

ES 2 588 306 T3

	35					40											45
Tyr	Lys	Ala	Ser	Asn	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
	50					55					60						
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65					70					75					80		
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala	His	Ser	Tyr	Pro	Phe		
				85					90					95			
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Asp	Ile		
			100					105						110			
Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg		
		115					120					125					
Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Ser	Tyr	Gly	Gln		
	130					135					140						
Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ala	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu		
145					150					155					160		
Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe		
				165						170				175			
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Pro	Val		
			180					185					190				
Gln	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Ala	Glu	Asp		
		195					200					205					
Ser	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Arg		
210						215					220						
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln		
225					230					235					240		
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr		
				245					250					255			
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser		
			260					265					270				
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr		
	275						280					285					
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys		
290						295					300						
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro		
305					310					315					320		
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
				325					330								

ES 2 588 306 T3

<210> 22  
 <211> 328  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia de la cadena ligera para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código LC4

<400> 22

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

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp  
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Asp Ile Val Leu  
 100 105 110

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr  
 115 120 125

Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Tyr  
 130 135 140

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 145 150 155 160

Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly

ES 2 588 306 T3

165 170 175  
 Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Gln Ala  
 180 185 190  
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala Glu Asp Ser Arg  
 195 200 205  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Arg Thr Val  
 210 215 220  
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
 245 250 255  
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
 260 265 270  
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
 275 280 285  
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 290 295 300  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
 305 310 315 320  
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 325

- <210> 23
- <211> 107
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<400> 23

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

ES 2 588 306 T3

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

<210> 24

<211> 329

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

ES 2 588 306 T3

	165		170		175															
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu				
				180					185					190						
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn				
			195					200					205							
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly				
		210					215					220								
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu				
	225					230					235					240				
	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr				
				245						250					255					
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn				
				260					265					270						
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe				
			275					280					285							
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn				
		290					295					300								
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr				
	305					310					315					320				
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly											
				325																

<210> 25  
 <211> 4  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Enlazador peptídico con cuatro residuos glicina

<400> 25

10  
 Gly Gly Gly Gly  
 1

<210> 26  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Enlazador peptídico con 5 residuos de aminoácido glicina

<400> 26

**Gly Gly Gly Gly Gly**  
1 5

5 <210> 27  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
< 223> Enlazador peptídico con 6 residuos de aminoácido glicina

10 <400> 27

**Gly Gly Gly Gly Gly Gly**  
1 5

15 <210> 28  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Enlazador peptídico con siete residuos de aminoácido glicina

20 <400> 28

**Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly**  
1 5

25 <210> 29  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Enlazador peptídico con ocho residuos de aminoácido glicina

<400> 29

30

**Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly**  
1 5

35 <210> 30  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
< 223> Enlazador peptídico artificial

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

<210> 31  
<211> 10  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> enlazador peptídico artificial

<400> 31

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

<210> 32  
<211> 582  
15 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia de la cadena pesada para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código HC10

<400> 32

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val  
115 120 125

Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
130 135 140

20 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile  
145 150 155 160



ES 2 588 306 T3

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

# ES 2 588 306 T3

405	410	415
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 420 425 430	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 435 440 445	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 450 455 460
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 465 470 475 480	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys 485 490 495	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 500 505 510
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 515 520 525	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 530 535 540	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser 545 550 555 560
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 565 570 575	Leu Ser Leu Ser Pro Gly 580	

- <210> 33
- <211> 582
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
  
- <220>
- <223> Secuencia de la cadena pesada para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código HC11
  
- <400> 33

10	15	20	25	30
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 Asn Ile Lys Asp Thr 20 25 30			

ES 2 588 306 T3

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser  
 115 120 125

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys  
 130 135 140

Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln  
 145 150 155 160

Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe  
 165 170 175

Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr  
 180 185 190

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

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe  
 210 215 220

Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val  
 225 230 235 240

Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ala Ser Thr  
 245 250 255

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 260 265 270

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

ES 2 588 306 T3

		275						280										285
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His			
	290					295												300
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser			
305					310					315								320
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys			
				325					330					335				
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu			
			340					345						350				
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro			
		355					360						365					
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys			
	370					375					380							
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val			
385					390					395								400
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp			
				405					410					415				
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr			
			420					425					430					
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp			
		435					440						445					
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu			
	450					455						460						
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg			
465					470					475					480			
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys			
				485					490					495				
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp			
			500					505					510					
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys			
		515					520					525						

ES 2 588 306 T3

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
530 535 540

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
545 550 555 560

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
565 570 575

Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
580

<210> 34

<211> 571

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena pesada para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código HC12

<400> 34

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Gly Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro  
115 120 125

Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser  
130 135 140

10 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln



ES 2 588 306 T3

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
405 410 415

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
420 425 430

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
435 440 445

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
450 455 460

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
465 470 475 480

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
485 490 495

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
500 505 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
565 570

<210> 35

<211> 571

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena pesada para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código HC13

<400> 35

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly  
20 25 30

10 Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu





ES 2 588 306 T3

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu  
 290 295 300

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
 305 310 315 320

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
 325 330 335

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
 340 345 350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 355 360 365

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 370 375 380

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 385 390 395 400

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 405 410 415

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 420 425 430

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 435 440 445

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 450 455 460

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 465 470 475 480

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 485 490 495

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 500 505 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 565 570

<210> 36  
 <211> 572  
 <212> PRT

ES 2 588 306 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena pesada para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código HC14

<400> 36

5

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

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

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

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

Glu 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Gln  
 115 120 125

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys  
 130 135 140

Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr Trp Leu Gly Trp Val Arg  
 145 150 155 160

Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile Gly Ile Met Ser Pro Val  
 165 170 175

ES 2 588 306 T3

Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Met  
 180 185 190

Ser Val Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu  
 195 200 205

Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Pro Gly  
 210 215 220

Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 245 250 255

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 260 265 270

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

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 290 295 300

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
 305 310 315 320

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 325 330 335

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
 340 345 350

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 355 360 365

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 370 375 380

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 385 390 395 400

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 405 410 415

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 420 425 430

ES 2 588 306 T3

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 435 440 445

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 450 455 460

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 465 470 475 480

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 485 490 495

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 500 505 510

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 515 520 525

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 530 535 540

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 545 550 555 560

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 565 570

<210> 37

<211> 572

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena pesada para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código HC15

<400> 37

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile  
 35 40 45

Gly Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60

10

ES 2 588 306 T3

Gln Gly Gln Val Thr Met Ser Val Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly  
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala  
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly  
165 170 175

His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
180 185 190

Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr  
210 215 220

Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
225 230 235 240

Ser Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
245 250 255

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
260 265 270

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

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
290 295 300

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
305 310 315 320

ES 2 588 306 T3

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 325 330 335

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
 340 345 350

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 355 360 365

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 370 375 380

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 385 390 395 400

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 405 410 415

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 420 425 430

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 435 440 445

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 450 455 460

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 465 470 475 480

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 485 490 495

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 500 505 510

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 515 520 525

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 530 535 540

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 545 550 555 560

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 565 570

<210> 38

<211> 571

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena pesada para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código HC16

<400> 38

ES 2 588 306 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Glu 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Val Gln Leu Val Glu  
 115 120 125  
 Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys  
 130 135 140  
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg  
 145 150 155 160  
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Tyr Asp  
 165 170 175  
 Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile  
 180 185 190  
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Gly Leu  
 195 200 205

ES 2 588 306 T3

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Arg Thr  
 210 215 220

Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 225 230 235 240

Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser  
 245 250 255

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
 260 265 270

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
 275 280 285

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu  
 290 295 300

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
 305 310 315 320

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
 325 330 335

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
 340 345 350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 355 360 365

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 370 375 380

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 385 390 395 400

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 405 410 415

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 420 425 430

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 435 440 445

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 450 455 460



ES 2 588 306 T3

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
465 470 475 480

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
485 490 495

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
500 505 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
565 570

<210> 39

<211> 571

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena pesada para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código HC17

<400> 39

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

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

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

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

10

ES 2 588 306 T3

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly  
 115 120 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 130 135 140

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 145 150 155 160

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His  
 165 170 175

Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 180 185 190

Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
 195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala  
 210 215 220

Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 225 230 235 240

Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser  
 245 250 255

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
 260 265 270

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
 275 280 285

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu  
 290 295 300

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
 305 310 315 320

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
 325 330 335

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
 340 345 350

ES 2 588 306 T3

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 355 360 365

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 370 375 380

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 385 390 395 400

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 405 410 415

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 420 425 430

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 435 440 445

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 450 455 460

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 465 470 475 480

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 485 490 495

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 500 505 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 565 570

<210> 40

<211> 334

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena ligera para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código LC10

<400> 40

ES 2 588 306 T3

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

ES 2 588 306 T3

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
 245 250 255

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn  
 260 265 270

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
 275 280 285

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala  
 290 295 300

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
 305 310 315 320

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 325 330

<210> 41  
 <211> 334  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de la cadena ligera para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código LC11

<400> 41

10

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

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

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

Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His  
 85 90 95

Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly  
 100 105 110

ES 2 588 306 T3

Gly Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
 115 120 125

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val  
 130 135 140

Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 145 150 155 160

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg  
 165 170 175

Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 180 185 190

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr  
 195 200 205

Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly  
 210 215 220

Gly Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
 225 230 235 240

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
 245 250 255

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn  
 260 265 270

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
 275 280 285

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala  
 290 295 300

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
 305 310 315 320

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 325 330

<210> 42

<211> 333

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena ligera para V-Ig dual de cruzamiento con el código LC12

<400> 42

ES 2 588 306 T3

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

ES 2 588 306 T3

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn  
 245 250 255

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
 260 265 270

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys  
 275 280 285

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp  
 290 295 300

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu  
 305 310 315 320

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 325 330

<210> 43

<211> 333

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena ligera para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código LC13

<400> 43

10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser  
 20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg Leu Pro His  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Gly  
 100 105 110



ES 2 588 306 T3

Gly Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser  
 115 120 125

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser  
 130 135 140

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu  
 145 150 155 160

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe  
 165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
 180 185 190

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

Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Ala Glu Ile Lys Gly Gly Gly  
 210 215 220

Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
 225 230 235 240

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn  
 245 250 255

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
 260 265 270

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys  
 275 280 285

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp  
 290 295 300

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu  
 305 310 315 320

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 325 330

<210> 44

<211> 333

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia de la cadena ligera para V-Ig dual de cruzamiento con el código LC14

<400> 44

5

ES 2 588 306 T3

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

ES 2 588 306 T3

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn  
 245 250 255

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
 260 265 270

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys  
 275 280 285

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp  
 290 295 300

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu  
 305 310 315 320

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 325 330

<210> 45

<211> 333

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena ligera para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código LC15

<400> 45

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Gly  
 100 105 110

10 Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser

ES 2 588 306 T3

115	120	125																		
Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser					
130						135					140									
Ser	Trp	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser					
145					150					155					160					
Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe					
				165					170					175						
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu					
		180						185					190							
Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ile	Tyr					
		195					200						205							
Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly					
	210					215					220									
Gly	Gly	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser					
225					230					235					240					
Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn					
				245					250					255						
Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala					
			260					265					270							
Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys					
		275					280					285								
Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp					
	290					295					300									
Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu					
305					310					315					320					
Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
				325					330											

<210> 46

<211> 333

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena ligera para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código LC16

<400> 46

ES 2 588 306 T3

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

ES 2 588 306 T3

245 250 255

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
260 265 270

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys  
275 280 285

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp  
290 295 300

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu  
305 310 315 320

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
325 330

<210> 47

<211> 333

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la cadena ligera para V-Ig dual de entrecruzamiento con el código LC17

<400> 47

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Gly  
100 105 110

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

10

ES 2 588 306 T3

Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly  
 130 135 140

Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu  
 145 150 155 160

Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu  
 180 185 190

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu  
 195 200 205

Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Gly Gly Gly  
 210 215 220

Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
 225 230 235 240

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn  
 245 250 255

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
 260 265 270

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys  
 275 280 285

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp  
 290 295 300

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu  
 305 310 315 320

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 325 330

<210> 48

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazador peptídico

<400> 48

10

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Enlazador peptídico

5 <400> 49

**Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser**  
 1 5

<210> 50  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>  
 <223> Enlazador peptídico

<400> 50

**Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro**  
 1 5

15

<210> 51  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>  
 <223> Enlazador peptídico

<400> 51

**His Ile Asp Ser Pro Asn Lys**  
 1 5

25

<210> 52  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>  
 <223> Enlazador peptídico

<400> 52

**Thr Lys Gly Pro Ser**  
 1 5

35

<210> 53  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Enlazador peptídico



<400> 53

**Thr Val Ala Ala Pro**  
1 5

5 <210> 54  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Enlazador peptídico

10 <400> 54

**Gln Pro Lys Ala Ala**  
1 5

15 <210> 55  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Enlazador peptídico

<400> 55

20

**Gln Arg Ile Glu Gly**  
1 5

25 <210> 56  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Enlazador peptídico artificial

<400> 56

**Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly**  
1 5

30 <210> 57  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Enlazador peptídico artificial

<400> 57

**Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly**  
1 5

<210> 58  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> Enlazador peptídico artificial

<400> 58

**Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly**  
**1 5**

10 <210> 59  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

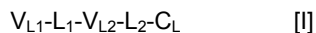
15 <220>  
<223> Enlazador peptídico artificial

<400> 59

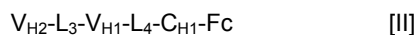
**Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly**  
**1 5**

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión similar a anticuerpo que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno, en donde dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula:



5 y dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula:



en donde:

$V_{L1}$  es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{L2}$  es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

10  $V_{H1}$  es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$V_{H2}$  es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$C_L$  es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

$C_{H1}$  es el dominio constante de la cadena pesada  $C_{H1}$  de inmunoglobulina;

15  $F_c$  es la región de bisagra de inmunoglobulina y  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  son los dominios constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina;

$L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  y  $L_4$  son enlazadores de aminoácidos;

en donde:

$L_1$  es 3 a 12 residuos aminoácidos de longitud;

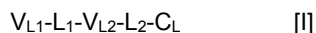
$L_2$  es 3 a 14 residuos aminoácidos de longitud;

20  $L_3$  es 1 a 8 residuos aminoácidos de longitud;

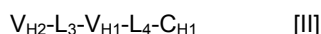
$L_4$  es 1 a 3 residuos aminoácidos de longitud;

y en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.

25 2. Una proteína de unión similar a anticuerpo que comprende dos cadenas polipeptídicas que forman dos sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula:



y una segunda cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula:



en donde:

30  $V_{L1}$  es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{L2}$  es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{H1}$  es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$V_{H2}$  es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$C_L$  es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

$C_{H1}$  es el dominio constante de la cadena pesada  $C_{H1}$  de inmunoglobulina; y

$L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  y  $L_4$  son enlazadores de aminoácidos;

en donde:

5  $L_1$  es 3 a 12 residuos aminoácidos de longitud;

$L_2$  es 3 a 14 residuos aminoácidos de longitud;

$L_3$  es 1 a 8 residuos aminoácidos de longitud;

$L_4$  es 1 a 3 residuos aminoácidos de longitud;

y en donde los primero y segundo polipéptidos forman un par de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.

10 3. La proteína de unión similar a anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, en donde:

$L_1$  es 5 a 10 residuos aminoácidos de longitud;

$L_2$  es 5 a 8 residuos aminoácidos de longitud;

$L_3$  es 1 a 5 residuos aminoácidos de longitud;

$L_4$  es 1 a 2 residuos aminoácidos de longitud.

15 4. La proteína de unión similar a anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, en donde:

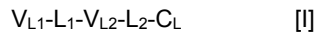
$L_1$  es 7 residuos aminoácidos de longitud;

$L_2$  es 5 residuos aminoácidos de longitud;

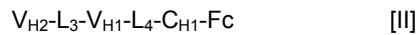
$L_3$  es 1 residuo aminoácido de longitud;

$L_4$  es 2 residuos aminoácidos de longitud.

20 5. Una proteína de unión similar a anticuerpo que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno, en donde dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula:



y dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula:



25 en donde:

$V_{L1}$  es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{L2}$  es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

$V_{H1}$  es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

$V_{H2}$  es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

30  $C_L$  es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

$C_{H1}$  es el dominio constante de la cadena pesada  $C_{H1}$  de inmunoglobulina;

Fc es la región de bisagra de inmunoglobulina y C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> son los dominios constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina;

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> son enlazadores de aminoácidos;

en donde:

5 L<sub>1</sub> es 1 a 3 residuos aminoácidos de longitud;

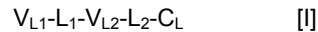
L<sub>2</sub> es 1 a 4 residuos aminoácidos de longitud;

L<sub>3</sub> es 2 a 15 residuos aminoácidos de longitud;

L<sub>4</sub> es 2 a 15 residuos aminoácidos de longitud;

10 y en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.

6. Una proteína de unión similar a anticuerpo que comprende dos cadenas polipeptídicas que forman dos sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula:



y una segunda cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula:



en donde:

V<sub>L1</sub> es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V<sub>L2</sub> es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V<sub>H1</sub> es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

20 V<sub>H2</sub> es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C<sub>L</sub> es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

C<sub>H1</sub> es el dominio constante de la cadena pesada C<sub>H1</sub> de inmunoglobulina; y

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> son enlazadores de aminoácidos;

en donde:

25 L<sub>1</sub> es 1 a 3 residuos aminoácidos de longitud;

L<sub>2</sub> es 1 a 4 residuos aminoácidos de longitud;

L<sub>3</sub> es 2 a 15 residuos aminoácidos de longitud;

L<sub>4</sub> es 2 a 15 residuos aminoácidos de longitud;

y en donde los primero y segundo polipéptidos forman un par de cadena ligera-cadena pesada de entrecruzamiento.

30 7. La proteína de unión similar a anticuerpo de la reivindicación 5 ó 6, en donde:

L<sub>1</sub> es 1 a 2 residuos aminoácidos de longitud;

L<sub>2</sub> es 1 a 2 residuos aminoácidos de longitud;

L<sub>3</sub> es 4 a 12 residuos aminoácidos de longitud;

L<sub>4</sub> es 2 a 12 residuos aminoácidos de longitud.

8. La proteína de unión similar a anticuerpo de la reivindicación 5 ó 6, en donde:

L<sub>1</sub> es 1 residuo aminoácido de longitud;

5 L<sub>2</sub> es 2 residuos aminoácidos de longitud;

L<sub>3</sub> es 7 residuos aminoácidos de longitud;

L<sub>4</sub> es 5 residuos aminoácidos de longitud.

9. La proteína de unión similar a anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 ó 6, en donde la proteína de unión es capaz de unirse específicamente a una o más dianas de antígenos, en donde, preferiblemente, las una o más dianas de antígenos se selecciona del grupo que consiste en B7.1, B7.2, BAFF, BlyS, C3, C5, CCL11 (eotaxina), CCL15 (MIP-1d), CCL17 (TARC), CCL19 (MIP-3b), CCL2 (MCP-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), SLC, CCL24 (MIPF-2/eotaxina-2), CCL25 (TECK), CCL26 (eotaxina-3), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CD3, CD19, CD20, CD24, CD40, CD40L, CD80, CD86, CDH1 (E-cadherina), quitinasa, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), CTLA4, CX3CL1 (SCYD1), CXCL12 (SDF1), CXCL13, EGFR, FCER1A, FCER2, HER2, IGF1R, IL-1, IL-12, IL13, IL15, IL17, IL18, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1β, IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL9, IL12/23, IL22, IL23, IL25, IL27, IL35, ITGB4 (b 4 integrina), LEP (leptina), MHC clase II, TLR2, TLR4, TLR5, TNF, TNFα, TNFSF4 (ligando OX40), TNFSF5 (ligando CD40), receptores similares a Toll, TREM1, TSLP, TWEAK, XCR1 (GPR5/CCXCR1), DNGR-1(CLEC91) y HMGB1.

10. La proteína de unión similar a anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 ó 6, en donde la proteína de unión es biespecífica y es capaz de unirse a dos dianas de antígenos diferentes, preferiblemente, las dos dianas de antígenos diferentes se seleccionan del grupo que consiste en IL4 e IL13, IGF1R y HER2, IGF1R y EGFR, EGFR y HER2, BK e IL13, PDL-1 y CTLA-4, CTLA4 y MHC clase II, IL-12 e IL-18, IL-1α e IL-1β, TNFα e IL12/23, TNFα e IL-12p40, TNFα e IL1β, TNFα e IL-23, e IL17 e IL23.

11. La proteína de unión similar a anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 ó 6, en donde la proteína de unión es capaz de inhibir la función de una o más de las dianas de antígenos.

12. La proteína de unión similar a anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 ó 6, en donde al menos uno de los enlazadores seleccionados del grupo que consiste en L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> contiene al menos un residuo cisteína.

13. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión similar a anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 ó 6.

14. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13.

15. Una célula huésped aislada que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13 o el vector de expresión de la reivindicación 14, en donde, preferiblemente, la célula huésped es una célula de mamífero o una célula de insecto.

16. Una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión similar a anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 ó 6.

FIG. 1

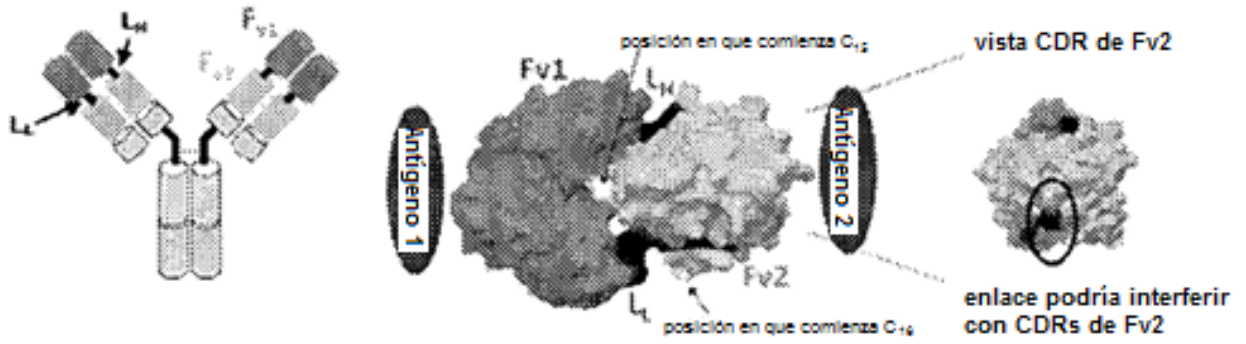


FIG. 2

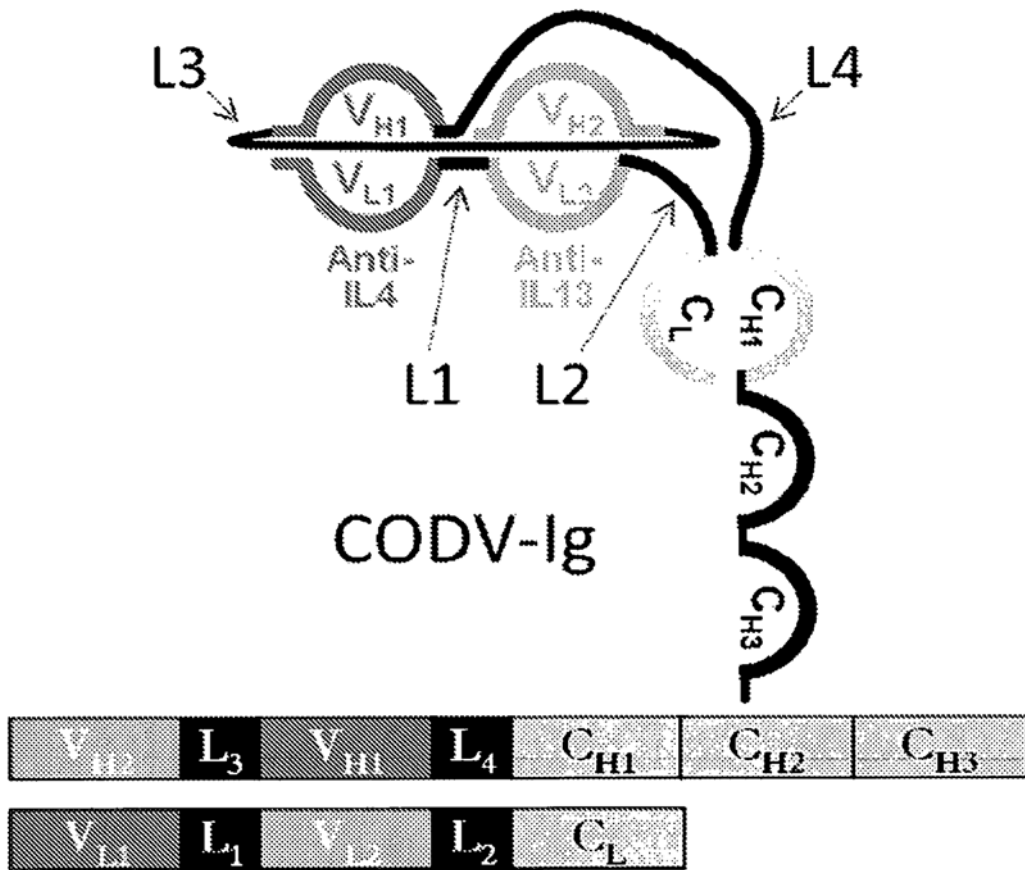




FIG. 3

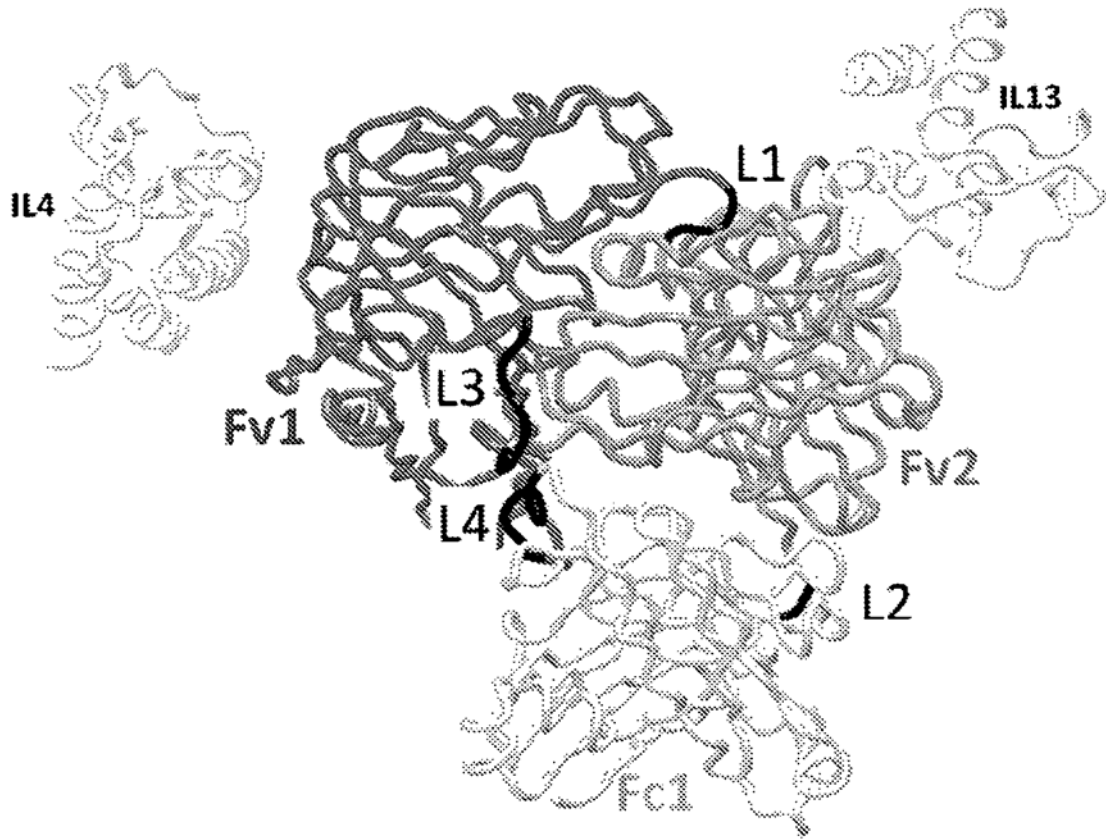


FIG. 4

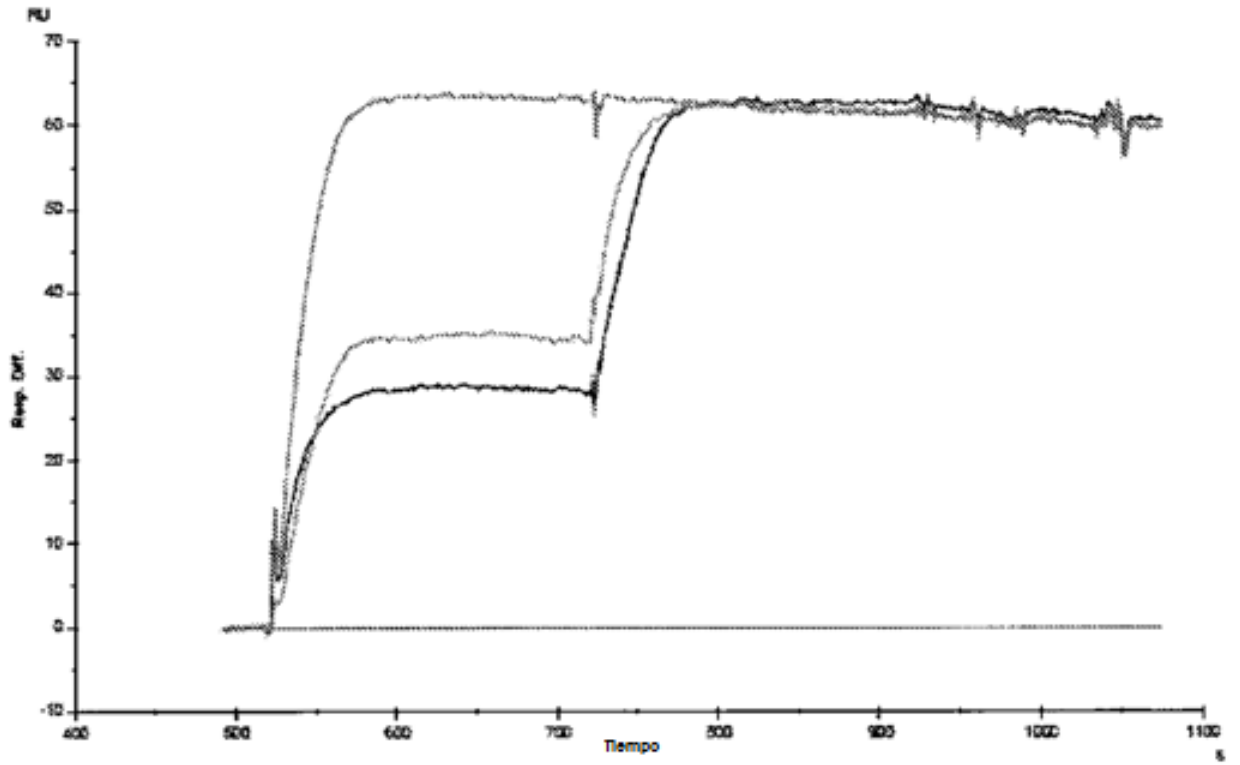


FIG. 5

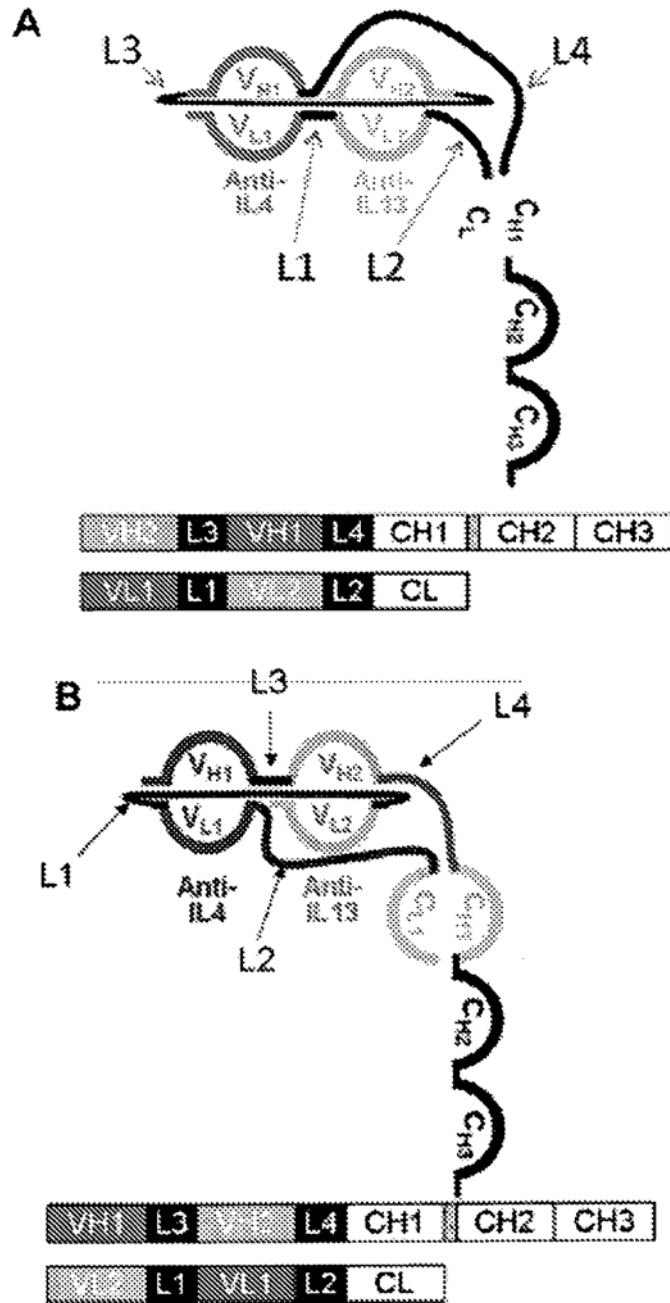


FIG. 6

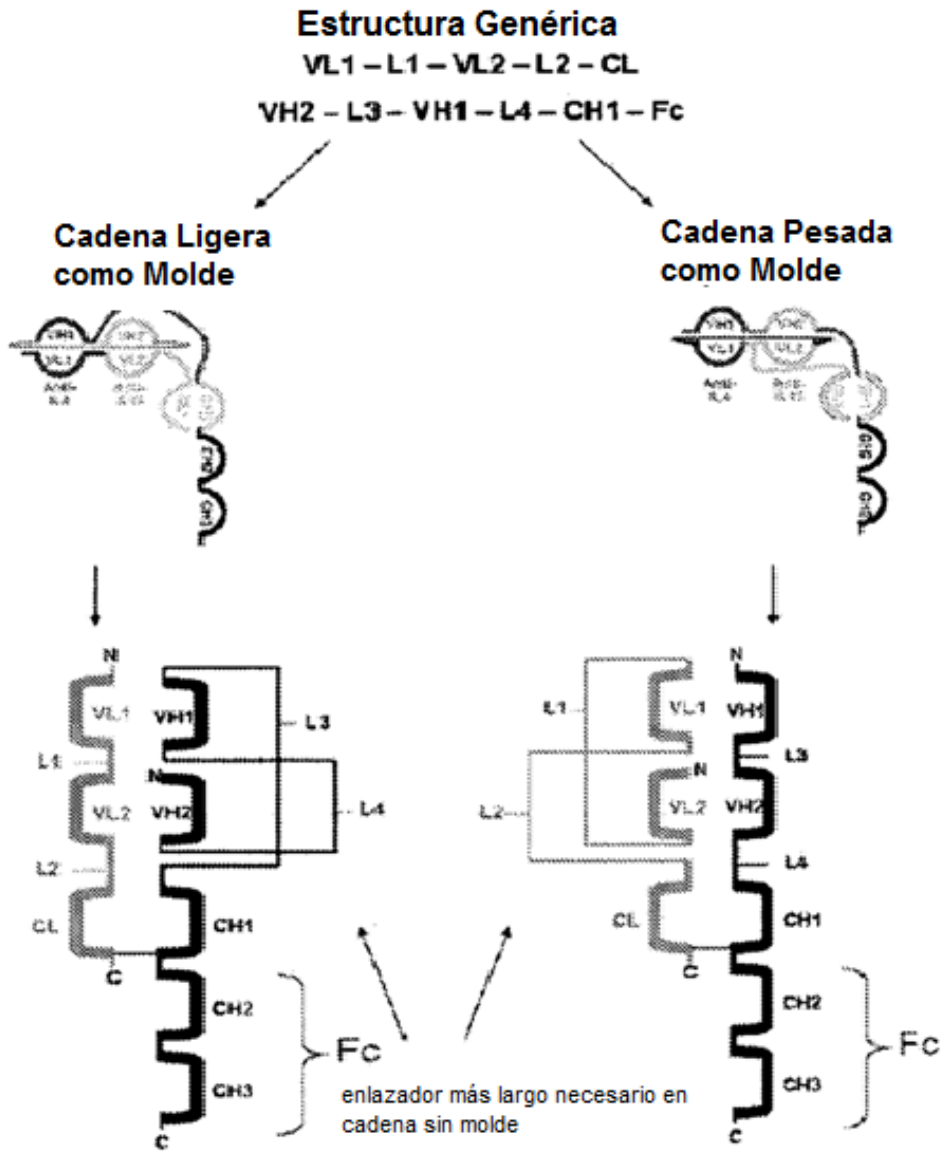
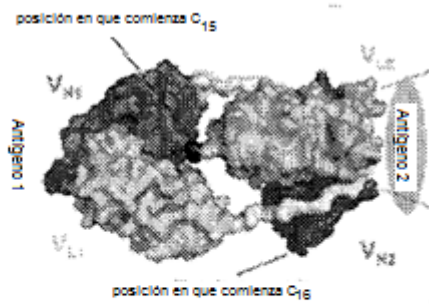
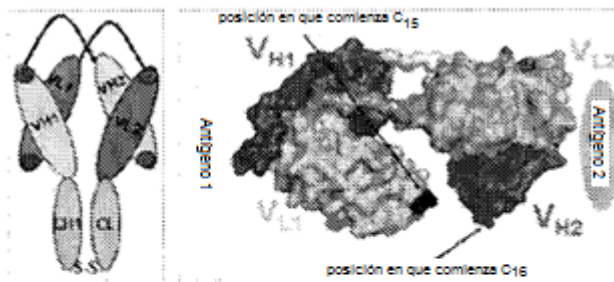


FIG. 7



	T. enlace [1/Ms]	T. desenganche[1/s]	KD [M]
anti-IL4 mAb parental	2.49E+07	1.95E-04	7.83E-12
anti-IL13 mAb parental	1.59E+06	1.30E-04	9.19E-11
TBT1 (IL4)	5.70E+06	1.50E-04	2.63E-11
TBT1 (IL13)	3.29E+06	1.70E-04	5.18E-11



	T. enlace [1/Ms]	T. desenganche[1/s]	KD [M]
anti-IL4 mAb parental	2.49E+07	1.95E-04	7.83E-12
anti-IL13 mAb parental	1.59E+06	1.30E-04	9.19E-11
CODH (IL4)	3.16E+07	2.69E-04	9.14E-12
CODH (IL13)	1.20E+06	1.12E-04	9.34E-11

FIG. 8

