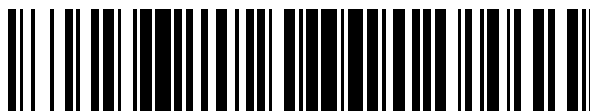


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 991**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2013 PCT/EP2013/074142**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14076292**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2013 E 13792035 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2920210**

54 Título: **Anticuerpo biespecífico recombinante que se une a CD20 y CD95**

30 Prioridad:

19.11.2012 EP 12193196

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

16.01.2018

73 Titular/es:

**BALIOPHARM AG (100.0%)
Stänzlergasse 4
4051 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**HERRMANN, ANDREAS y
GROSSE-HOVEST, LUDGER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 649 991 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

Anticuerpo biespecífico recombinante que se une a CD20 y CD95

La invención se refiere a un nuevo formato de anticuerpo biespecífico que se une a CD20 y CD95.

Antecedentes

- 5 CD95/Fas/Apo-1 es un receptor de superficie celular capaz de inducir la muerte apoptótica de células humanas. De forma similar al ligando fisiológico de este receptor, CD95L, los anticuerpos anti-CD95 agonísticos pueden inducir la apoptosis si la unión con CD95 ocurre en un formato multimérico, por ejemplo como IgM pentamérica o IgG3 autoagregante. Alternativamente, los anticuerpos anti-CD95 se pueden entrecruzar mediante receptores de Fc en células vecinas o mediante anticuerpos secundarios para lograr actividad agonística.
- 10 Dado que muchas células tumorales expresan CD95, se ha perseguido tenazmente el uso de anticuerpos anti-CD95 agonísticos para la terapia de tumores después de la caracterización inicial de anticuerpos CD95 prototípicos. Sin embargo, pronto se evidenció que, al menos en su forma más simple de aplicar anticuerpos anti CD95 agonísticos o CD95L recombinante a pacientes, este enfoque falla porque muchos tipos de células normales expresan CD95 funcional y pueden ser destruidas por anticuerpos agonísticos.
- 15 El CD20 es un marcador de células B implicadas en muchos linfomas y enfermedades autoinmunitarias, p. ej. esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoide (RA) y lupus eritematoso sistémico (SLE).

- Los anticuerpos dirigidos contra el antígeno de superficie CD20 asociado a las células B pueden dirigirse tanto a las células B normales como a las malignas. Se utilizan con éxito en el tratamiento de la leucemia y el linfoma derivados de células B y la enfermedad autoinmunitaria mediada por anticuerpos, respectivamente. El Rituximab (nombres comerciales Rituxan y MabThera) es un anticuerpo monoclonal quimérico contra la proteína CD20. El rituximab destruye las células B y por ello se usa para tratar enfermedades que se caracterizan por un número excesivo de células B, células B hiperactivas o células B disfuncionales. Esto incluye muchos linfomas, leucemias, rechazo de trasplantes y algunos trastornos autoinmunitarios.
- 20 Sin embargo, el rituximab mata células CD20-positivas de forma no específica, y se demostró que es clínicamente eficaz en la MS pero está comprometido por efectos secundarios (por ejemplo, leucoencefalopatía multifocal progresiva, PML).

- 25 Se demostró con anterioridad que los fragmentos biespecíficos $F(ab')_2$ (bs- $F(ab')_2$) con especificidad para CD95 y diferentes antígenos diana en células de linfoma, tales como CD20 y CD40, inducen la apoptosis de células positivas para CD95 y el antígeno diana correspondiente. Las células de linfoma que expresan CD95 pero no el antígeno diana no fueron destruidas (Jung et al. Cancer Research 61, 1846 - 1848 (2001)).
- 30 Herrmann et al. (Cancer Research 68 (4): 1221 - 7 (2008) evaluaron la influencia del formato del anticuerpo y la naturaleza del antígeno diana sobre la apoptosis mediada por CD95 selectiva en células tumorales.

- El documento US2003/0232049A1 describe un reactivo multiespecífico para estimular selectivamente los receptores de la superficie de la célula. Se describen anticuerpos biespecíficos consistentes en fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno con un primer sitio de unión para un receptor de superficie celular, tal como un receptor de muerte, p. ej. CD95, y un segundo sitio de unión para un antígeno diana de la misma célula, tal como CD20 o CD40, para destruir células cancerosas.
- 35

Compendio de la invención.

- 40 El objetivo de la invención es proporcionar un formato de anticuerpo biespecífico dirigido contra CD20 y CD95, con una actividad biológica mejorada.

El objeto se resuelve mediante el tema como se reivindica.

De acuerdo con la invención, se proporciona un formato de anticuerpo biespecífico que comprende o consiste en

- a) un fragmento Fab que comprende un primer sitio de unión para un primer antígeno;
- b) un fragmento scFv que comprende un segundo sitio de unión para un segundo antígeno;
- 45 c) opcionalmente secuencia o secuencias enlazadoras; y
- d) un dominio CH2, en el que el fragmento Fab y el fragmento scFv están unidos a través del dominio CH2, en donde
- el primer antígeno es CD95 y el segundo antígeno es CD20; o
 - el primer antígeno es CD20 y el segundo antígeno es CD95.

Específicamente, el formato del anticuerpo comprende una estructura como la representada en la Figura 1A. Se llama por ejemplo NA-C20 o Novotarg.

De acuerdo con una realización específica, el formato es una construcción que comprende o que consiste en

- 5 a) un fragmento Fab que consiste en un par de dominios VL/VH y un par de dominios CL/CH1, el cual fragmento Fab comprende el primer sitio de unión;
- b) un scFv que consiste en dominios VH/VL unidos entre sí;
- c) opcionalmente, secuencia o secuencias enlazadoras; y
- d) un dominio CH2 que une el dominio CH1 del fragmento Fab de a) al dominio VH del scFv de b),
- donde
- 10 -el primer antígeno es CD95 y el segundo antígeno es CD20; o
- el primer antígeno es CD20 y el segundo antígeno es CD95.

La estructura se basa en dominios de anticuerpo específicos con o sin secuencias enlazadoras.

15 El formato de anticuerpo de la invención es preferiblemente un formato de anticuerpo recombinante, producido por una célula caliente recombinante que comprende secuencias heterólogas para expresar dicho formato de anticuerpo.

Preferiblemente, el formato de anticuerpo de la invención es un formato de anticuerpo monoclonal, que puede comprender secuencias de aminoácidos nativas o comprender una o más mutaciones de la secuencia de aminoácidos, la estructura terciaria y opcionalmente la glicosilación, p. ej. para mejorar la especificidad, la afinidad y/o avidez de unión a una diana, o para mejorar la estabilidad del formato, o aumentar la capacidad de producción de la molécula recombinante.

20

Específicamente, los dominios del anticuerpo son de origen mamífero, tales como roedores, p. ej. murino, o de origen humano, o dominios de anticuerpos quiméricos o humanizados de origen mamífero distinto del humano, tales como dominios de anticuerpos murinos o camélidos humanizados.

25 De acuerdo con un aspecto específico, el sitio de unión que se une a CD20 comprende seis regiones determinantes de complementariedad de dominios variables del anticuerpo (CDR1 a CDR6), en donde

- A)
- i) CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos RASSSVSYM (SEC ID 12);
- ii) CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos APSNLAS (SEC ID 13);
- iii) CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQWSFNPPT (SEC ID 14);
- 30 iv) CDR4 comprende la secuencia de aminoácidos SYNMH (SEC ID 16);
- v) CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEC ID 17); y
- vi) CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos WYYSNSYWFYFDV (SEC ID 18);
- o
- B) una variante funcionalmente activa de la misma, en la que al menos uno de
- 35 i) CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos RASSSVSYM (SEC ID 12), o al menos un 80% o al menos un 90%;
- ii) CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos APSNLAS (SEC ID 13), o al menos un 80% o al menos un 90%;
- 40 iii) CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos QQWSFNPPT (SEC ID 14), o al menos un 80% o al menos un 90%;
- iv) CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SYNMH (SEC ID 16), o al menos un 80% o al menos un 90%;

v) CDR5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEC ID 17), o al menos el 80% o al menos el 90%; y/o

5 vi) CDR6 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos VVYYSNSYWFYFDV (SEC ID 18), o al menos un 80% o al menos un 90%.

10 La invención contempla específicamente el uso de cualquier formato de anticuerpo que comprenda un sitio de unión con CD20 derivado de las secuencias A i) a vi) anteriores, p. ej. las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera y/o las secuencias CDR4, CDR5 y CDR6 de la región variable de la cadena pesada, que incluyen construcciones que comprenden dominios variables individuales que comprenden o bien la combinación de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, o la combinación de las secuencias CDR4, CDR5 y CDR6, o pares de tales dominios variables simples, por ejemplo pares de dominios VH, VHH o VH/VL.

Las realizaciones específicas se refieren al formato de anticuerpo que comprende al menos una de las secuencias de CDR de A, preferiblemente al menos dos o al menos tres, y al menos una de las secuencias de CDR de B.

15 Otras realizaciones específicas se refieren al formato de anticuerpo que comprende al menos una de las secuencias de CDR de B, preferiblemente al menos dos o al menos tres, y al menos una de las secuencias de CDR de A.

20 Las realizaciones específicas se refieren al uso de una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia CDR1 de A i), la secuencia CDR2 de A ii) y la secuencia CDR3 de A iii), y una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia CDR4 de A iv) o B iv), la secuencia CDR5 de A v) o B v) y la secuencia CDR6 de A vi) o B vi), en donde al menos una de las secuencias CDR4, CDR5 y CDR6 comprende una variante de B funcionalmente activa.

25 Otras realizaciones específicas se refieren al uso de una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia CDR4 de A iv), la secuencia CDR5 de A v) y la secuencia CDR6 de A vi), y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia CDR1 de A i) o B i), la secuencia CDR2 de A ii) o B ii) y la secuencia CDR3 de A iii) o B iii), en donde al menos una de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 comprende una variante de B funcionalmente activa.

Una variante de B comprende opcionalmente la secuencia de CDR específica como la listada, que contiene mutaciones de uno, dos o tres puntos, p. ej. por inserción, delección, sustitución o derivatización química de un resto de aminoácido.

30 Las variantes de un aglutinante CD20 se consideran variantes funcionalmente activas, si se unen a CD20, específicamente a CD20 humano, en particular con una alta afinidad, p. ej. con un $K_d < 10^{-8}$.

De acuerdo con una realización específica, el formato de anticuerpo biespecífico comprende un dominio VL que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 11 y/o un dominio VH que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 15, o variantes de la misma funcionalmente activas.

35 Específicamente, la variante es una variante humanizada que comprende un dominio VL que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID 19 y/o un dominio VH que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID 20, o una variante de la misma funcionalmente activa.

De acuerdo con un aspecto específico, el sitio de unión que se une a CD95 comprende seis regiones determinantes de complementariedad de dominios de anticuerpo variables (CDR1 a CDR6), en donde

40 A)

i) CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos RASESVEYYGTSLMQ (SEC ID 2);

ii) CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos VASNVES (SEC ID 3);

iii) CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQSTKVPWT (SEC ID 4);

iv) CDR4 comprende la secuencia de aminoácidos TNAMN (SEC ID 6);

45 v) CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos RIRSKSNYYATYYAESVKD (SEC ID 7); y

vi) CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos DGY Y (SEC ID 8);

o

B) una variante funcionalmente activa de la misma, en la que al menos uno de

- i) CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos RASESVEYYGTSLMQ (SEC ID 2), o al menos 80% o al menos 90%;
- ii) CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos VASNVES (SEC ID 3), o al menos 80% o al menos 90%;
- 5 iii) CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos QQSTKVPWT (SEC ID 4), o al menos 80% o al menos 90%;
- iv) CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos TNAMN (SEC ID 6), o al menos 80% o al menos 90%;
- 10 v) CDR5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos RIRSKSNYYATYYAESVKD (SEC ID 7), o al menos un 80% o al menos un 90%; y/o
- vi) CDR6 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DGY Y (SEC ID 8), o al menos 80% o al menos 90%.
- 15 La invención contempla específicamente el uso de cualquier formato de anticuerpo que comprenda un sitio de unión a CD95 derivado de las secuencias A i) a vi) anteriores, p. ej. las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera y/o las secuencias CDR4, CDR5 y CDR6 de la región variable de la cadena pesada, que incluyen construcciones que comprenden dominios variables individuales que comprenden cualquiera de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, o la combinación de las secuencias CDR4, CDR5 y CDR6, o pares de tales dominios variables individuales, por ejemplo pares de dominios VH, VHH o VH/VL.
- 20 Las realizaciones específicas se refieren al formato de anticuerpo que comprende al menos una de las secuencias de CDR de A, preferiblemente al menos dos o al menos tres, y al menos una de las secuencias de CDR de B.
- Otras realizaciones específicas se refieren al formato de anticuerpo que comprende al menos una de las secuencias de CDR de B, preferiblemente al menos dos o al menos tres, y al menos una de las secuencias de CDR de A.
- 25 Las realizaciones específicas se refieren al uso de una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia CDR1 de A i), la secuencia CDR2 de A ii) y la secuencia CDR3 de A iii), y una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia CDR4 de A iv) o B iv), la secuencia CDR5 de A v) o B v) y la secuencia CDR6 de A vi) o B vi), en donde al menos una de las secuencias CDR4, CDR5 y CDR6 comprende una variante funcionalmente activa de B .
- 30 Otras realizaciones específicas se refieren al uso de una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia CDR4 de A iv), la secuencia de CDR5 de A v) y la secuencia CDR6 de A vi), y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia CDR1 de A i) o B i), la secuencia CDR2 de A ii) o B ii) y la secuencia CDR3 de A iii) o B iii), en donde al menos una de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 comprende una variante funcionalmente activa de B.
- 35 Una variante de B comprende opcionalmente la secuencia de CDR específica listada, que contiene una, dos o tres mutaciones de punto, p. ej. por inserción, delección, sustitución o derivatización química de un resto de aminoácido.
- Las variantes de un aglutinante CD95 se consideran variantes funcionalmente activas, si se unen a CD95, específicamente a CD95 humana, en particular con una afinidad alta, p. ej. con un $K_d < 10^{-8}M$.
- 40 De acuerdo con una realización específica, el formato de anticuerpo biespecífico comprende un dominio VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 1 y/o un dominio VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 5, o variantes funcionalmente activas de la misma.
- Específicamente, la variante es una variante humanizada que comprende un dominio VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 9 y/o un dominio VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 10, o una variante funcionalmente activa de la misma.
- 45 De acuerdo con otra realización específica, el formato de anticuerpo biespecífico comprende o consiste en una secuencia de cadena ligera de SEC ID 21 y una secuencia de cadena pesada de SEC ID 23, o variantes funcionalmente activas de las mismas.
- Específicamente, la variante es una variante humanizada que comprende un dominio VL que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 26 y/o un dominio VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 28, o una variante funcionalmente activa de la misma.
- 50 El formato de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención comprende específicamente secuencias murinas, quiméricas, humanizadas y/o humanas.

ES 2 649 991 T3

Se prefiere que el formato de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se una a CD20 con una $K_d < 10^{-8}$ M y/o que se una a CD95 con una $K_d < 10^{-8}$ M.

Un ejemplo de construcción es una cadena única Fab biespecífica recombinante (bsFabXsc) con especificidad para CD20/CD95 descrita esquemáticamente en la Figura 1. Se denomina, por ejemplo, NA-C20 o Novotarg.

- 5 Específicamente, el formato puede derivarse de un anticuerpo de la clase IgG, en particular cualquiera de las subclases IgG1, IgG2 o IgG4, que comprende específicamente dominios de anticuerpos o secuencias derivadas de un anticuerpo IgG humano.

Específicamente, el formato puede derivarse de un anticuerpo IgG humano.

- 10 De acuerdo con otro aspecto específico, el formato del anticuerpo se proporciona para uso médico, preferiblemente para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno de las células B.

De acuerdo con un aspecto específico, el formato de anticuerpo de la invención se proporciona para uso médico para tratar una enfermedad asociada con un nivel no deseado o regulación al alza de células B, p. ej. células B excesivas o malignas, o un trastorno inmunitario causado por una respuesta inmunitaria anómala, excesiva o indeseada. Son ejemplo de condiciones patológicas las enfermedades autoinmunitarias o el cáncer, incluyendo la leucemia o el linfoma.

- 15 De acuerdo con la invención, se proporciona además un método para el tratamiento o la prevención de un trastorno de las células B, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de formato de anticuerpo biespecífico a un sujeto en necesidad del mismo.

- 20 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar las células B, que comprende poner en contacto dichas células con una composición que comprende el formato de anticuerpo biespecífico de la invención. Tal método de tratamiento puede ser *in vivo* o *ex vivo*.

Específicamente, el receptor de muerte CD95 y el antígeno de superficie de la célula CD20 expresado por dichas células son dirigidas por el formato de anticuerpo biespecífico, causando así la apoptosis y/o la inhibición de las células.

- 25 Específicamente, el formato de anticuerpo biespecífico de la invención es administrado a un sujeto en necesidad del mismo, en una cantidad terapéuticamente efectiva, preferiblemente proporcionada en una formulación para uso parenteral, p. ej. una formulación intravenosa o subcutánea, en particular en un preparado farmacéutico que comprende el formato de anticuerpo y opcionalmente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 30 De acuerdo con la invención, se proporciona además una composición farmacéutica que comprende un formato de anticuerpo de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Específicamente, la composición farmacéutica se proporciona para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno de las células B.

- 35 De acuerdo con la invención, se proporciona además un método para el tratamiento o prevención de un trastorno de las células B que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica a un sujeto en necesidad de la misma.

- 40 De acuerdo con otro aspecto, se proporciona adicionalmente un reactivo o kit de diagnóstico que comprende el formato de anticuerpo de la invención, para dirigir células B en una muestra, y opcionalmente que comprende además reactivos o herramientas de diagnóstico, p. ej. un marcador, para determinar la cantidad y/o calidad de las células B que causan un trastorno de las células B. Son ensayos adecuados los ensayos inmunoabsorbentes, tales como ELISA. El anticuerpo de acuerdo con la invención se puede conjugar con otras moléculas que permiten la detección simple de dicho conjugado, por ejemplo en ensayos de unión (por ejemplo, ELISA) y estudios de unión.

- 45 Además, de acuerdo con una realización específica, el formato de anticuerpo de acuerdo con la invención se conjuga con una molécula marcadora o reportera (informadora), p. ej. seleccionada entre el grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos, marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y mezclas de los mismos. Los anticuerpos conjugados con marcadores o moléculas informadoras pueden usarse, por ejemplo, en sistemas de ensayo o métodos de diagnóstico.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un método de diagnóstico, es decir un método para determinar células B en una muestra, que emplea el formato de anticuerpo de la presente invención.

- 50 La muestra puede ser una muestra de fluidos corporales, incluyendo sangre, suero u orina.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el formato de anticuerpo de la presente invención.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona además un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona además una célula hospedadora que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención o un vector de la presente invención.

- 5 De acuerdo con otro aspecto, se proporciona además un método para producir un formato de anticuerpo de la presente invención, que comprende cultivar o mantener una célula hospedadora de la presente invención bajo condiciones tales que dicha célula hospedadora produce el formato de anticuerpo.

Figuras.

- 10 Figura 1: Fab de cadena simple biespecífico recombinante (denominado también en el presente texto bsFabXsc o NA-C20 para la versión quimérica y Novotarg para la versión humanizada), que contiene un fragmento Fab unido a un scFv que usa un dominio monomérico CH2 como enlazador.

Descripción esquemática de un ejemplo de formato de anticuerpo de la invención: El formato de anticuerpo CD20 X CD95 biespecífico se proporciona para la estimulación selectiva del receptor de muerte CD95 en la superficie de células B normales, activadas o malignas que expresan a ambos, CD20 y CD95.

- 15 La secuencia de este anticuerpo, incluyendo las de los anticuerpos CD20 (2H7, murino, quimérico y humanizado) y CD95 (murino, quimérico y humanizado) se proporcionan en la Fig. 2E. La construcción genética que codifica el anticuerpo fue transfectada establemente en células Sp2/0 usando técnicas estándar. La proteína se purificó a partir de sobrenadantes de células transfectadas usando cromatografía de afinidad con resina KappaSelect, adquirida en GE-Healthcare, Chalfont St Giles, Reino Unido.

- 20 Figura 2: Secuencia de ejemplos de formatos de anticuerpo a los que se hace referencia en los Ejemplos.

Fig. 2A: Secuencias de VL y VH de ratón (SEC ID 1 y 5, respectivamente) de un formato de anticuerpo con un sitio de unión dirigido a CD95, las secuencias de CDR están subrayadas (CDR1, CDR2, CDR3 de VL: SEC ID 2-4; CDR1, CDR2, CDR3 de VH: SEC ID 6-8).

- 25 Fig. 2B: Secuencias de VL y VH (SEC ID 9 y 10, respectivamente) de un formato de anticuerpo con un sitio de unión dirigido a CD95 (humanizado), las secuencias de CDR están subrayadas.

Fig. 2C: Secuencias VL y VH (SEC ID 11 y 15, respectivamente) de un formato de anticuerpo con un sitio de unión dirigido a CD20 (murino, derivado del anticuerpo 2H7 como describen Liu et al. The Journal of Immunology 139, 3521 - 3526 (1987), NCBI Accession M17953 y M17954), las secuencias de CDR están subrayadas (CDR1, CDR2, CDR3 de VL: SEC ID 12-14; CDR1, CDR2, CDR3 de VH: SEC ID 16-18).

- 30 Fig. 2D: Secuencias VL y VH (SEC ID 19 y 20, respectivamente) de un formato de anticuerpo con un sitio de unión dirigido a CD20 (humanizado, derivado del anticuerpo 2H7), las secuencias de CDR están subrayadas.

Fig. 2E: Ejemplos de formatos de anticuerpos biespecíficos CD95xCD20, versiones quiméricas y humanizadas:

SEC ID 21: secuencia de aminoácidos de la versión quimérica, cadena ligera;

SEC ID 22: secuencia de nucleótidos de la versión quimérica, cadena ligera;

- 35 SEC ID 23: secuencia de aminoácidos de la versión quimérica, cadena pesada;

SEC ID 24: secuencia enlazadora;

SEC ID 25: secuencia de nucleótidos de la versión quimérica, cadena pesada;

SEC ID 26: secuencia de aminoácidos de la versión humanizada, cadena ligera;

SEC ID 27: secuencia de nucleótidos de la versión humanizada, cadena ligera;

- 40 SEC ID 28: secuencia de aminoácidos de la versión humanizada, cadena pesada;

SEC ID 29: secuencia de nucleótidos de la versión humanizada, cadena pesada.

Figura 3: Especificidad de unión de NA-C20 para CD20 y CD95.

- 45 Análisis de citometría de flujo de células CD95⁺/CD20⁺ Daudi (●) y células CD95⁺/CD20⁻ LN-18 (○) después de la incubación con las concentraciones indicadas de NA-C20 purificado (derivado de anticuerpo CD95XCD20 quimérico). Esto se comparó con la unión del anticuerpo en el sobrenadante no diluido del clon 5B12 (que expresa NA-C20). Anticuerpo de detección: Fcγ-PE humano de cabra, Jackson Immuno Research 109-116-098.

Figura 4: Especificidad de unión de Novotarg para CD20 y CD95.

Análisis de citometría de flujo de células CD95/CD20⁺ Daudi (●) y células CD95/CD20⁻ LN-18 (○) después de la incubación con las concentraciones indicadas de Novotarg purificado (derivado de anticuerpo CD95XCD20 humanizado). Esto se comparó con la unión del anticuerpo en las diluciones indicadas del sobrenadante del clon 25-CHO-S/BV004/K44 (que expresa Novotarg). Anticuerpo de detección: α Fcy-PE humana de cabra, Jackson Immuno Research 109-116-098.

Figura 5: vida mitad *in vivo* del derivado del anticuerpo CD95XCD20 quimérico.

Se inyectaron ratones C57BL6 (macho, 6 semanas de edad) con 50 µg de NA-C20 y se tomaron muestras de sangre a las 0,5 h, 1,0 h, 2,0 h y 4,0 h. El suero fue incubado con células SKW 6.4, que luego se analizaron en relación con el anticuerpo unido en una citometría de flujo (anticuerpo de detección: PE-Fcy antihumana de cabra, Jackson Immuno Research).

Figura 6: Capacidad de NA-C20 y Novotarg para activar CD95⁺/CD20⁺.

Ensayo de incorporación de timidina con células CD95⁺/CD20⁺ SWK 6.4 después de la incubación con las concentraciones indicadas de NA-C20 (●) o Novotarg (○). Las células no tratadas sirvieron de control negativo (solo células de columna), las células incubadas con un mAb de ratón contra Apo-1 (entrecruzado por un anticuerpo anti ratón de cabra) sirvieron de control positivo (columna GaM + Apo).

Figura 7: Prueba de NA-C20 en un modelo de ratón SCID.

Ocho ratones SCID fueron inyectados con una dosis letal de la línea celular CD20⁺/CD95⁺ B-linfoblastoide SKW 6.4 en el día 0. A continuación, los ratones fueron inyectados repetidamente con 20 µg de NA-C20 (○), NA-CMel (▼) o 100 µl de PBS (●) en los días 1, 2 y 3 después de la inoculación de células tumorales, o una vez en el día 1 después de la inoculación de células tumorales con 60 µg de anticuerpos quiméricos contra CD20 (■, ▽) y un anticuerpo dirigido contra EGFR (receptor del factor de crecimiento epitelial, □), respectivamente.

Descripción detallada.

La expresión "formato de anticuerpo" como se usa en el presente texto se referirá a polipéptidos o proteínas que consisten en o comprenden dominios de anticuerpo, que se entienden como dominios constantes y/o variables de las cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulinas, con o sin una secuencia enlazadora. El formato de anticuerpo de la invención es de una estructura específica, que comprende específicamente un sitio de unión de un fragmento Fab que consiste en un par de dominios VL/VH y dominios de anticuerpo constantes, tales como dominios CL/CH1, y comprende además un sitio de unión de un scFv, que está ligado al scFv por un dominio CH2.

Un anticuerpo digerido por papaína da tres fragmentos: dos fragmentos Fab y un fragmento Fc. Se entiende en el presente texto que el término "Fab" incluye Fab, F(ab) o F(ab'), que pueden incluir o no una región bisagra. El fragmento Fab es una estructura de anticuerpo que aún se une a antígenos, pero es monovalente sin porción Fc.

Los dominios de anticuerpos pueden ser de estructura nativa o modificados por mutagénesis o derivatización, p. ej. para modificar las propiedades de unión con el antígeno o cualquier otra propiedad, tal como la estabilidad o las propiedades funcionales, tales como la unión a los receptores Fc, receptores FcRn y/o Fcγ. Se considera que las secuencias polipeptídicas son dominios de anticuerpos, si comprenden una estructura de barril beta que consiste en al menos dos cadenas beta de una estructura de dominio de anticuerpo conectada por una secuencia de bucle.

La expresión "formato de anticuerpo" se referirá particularmente a polipéptidos o proteínas que muestran las propiedades de unión biespecífica, es decir, a los antígenos diana CD20 y CD95.

Los ejemplos de formatos de anticuerpo tienen una estructura específica como se representa en la Figura 1. Puede estar compuesta por un fragmento Fab, un dominio CH2 y un fragmento Fv de cadena simple (scFv), en particular un scFv en orientación VH/VL. La molécula de anticuerpo puede tener una cadena principal en la que el dominio CH2 está acoplado a través de su término N a los dominios CH1 y VH de la cadena pesada de un fragmento Fab y a través de su extremo C a un fragmento scFv.

También puede comprender una cadena principal en la que el dominio CH2 está ligado a la cadena ligera de un fragmento Fab, es decir, en la que la cadena principal incluye un dominio VL y un dominio CL, una región bisagra, un dominio CH2 y un fragmento Fv de cadena simple.

Otro ejemplo se refiere a un formato de anticuerpo en el que la cadena principal incluye un dominio VL y un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2 y un fragmento anscFv. Una segunda cadena de menor peso incluye un VH y un dominio CL. En tal formato de anticuerpo, el fragmento Fab no es pues un fragmento Fab "clásico (natural)" en el que el dominio variable de las cadenas ligera y pesada se fusiona con su dominio constante correspondiente (CL o CH1, respectivamente), sino un fragmento Fab "híbrido" en el que el dominio variable está fusionado con el dominio constante de la "cadena opuesta", es decir, el dominio VH se fusiona con el dominio CL y el dominio VL se fusiona con el dominio CH1.

De acuerdo con otro ejemplo, el formato de anticuerpo comprende una molécula con una cadena principal en la que el dominio CH2 está ligado a un dominio CL y a un dominio VH. Una segunda cadena de menor peso incluye un dominio VL y un dominio CH1.

5 Todavía, de acuerdo con otro ejemplo, el formato de anticuerpo comprende una molécula, que comprende modificaciones en el dominio bisagra y CH2, p.ej. para obtener un dominio CH2 monomérico, p. ej. un dominio CH2 en el que se han modificado los aminoácidos en el dominio CH2 y/o la región bisagra, p. ej. los restos de cisteína que forman enlaces disulfuro intercatenarios (C226 y/o C229 en anticuerpos IgG humanos, la numeración de los aminoácidos como se proporciona en el presente texto está en línea con la numeración de Kabat [índice UE]) se intercambian para prevenir la formación de dímeros. Ejemplos de mutaciones de punto son C226S y C229S. En una
10 realización, un enlace disulfuro entre el dominio bisagra de la primera cadena principal y un dominio bisagra de la segunda cadena principal se define por al menos un resto de cisteína en la posición 226 de la secuencia y un resto de cisteína en la posición 229 de la secuencia de uno de los dominios bisagra, de acuerdo con la numeración de Kabat [índice EU].

15 Un ejemplo de formato de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID 26 (cadena ligera) y SEC ID 28 (cadena pesada).

Otro ejemplo se refiere a la modificación para obtener la reducción de la posible actividad de ADCC y/o CDC, p. ej. mediante un cambio de subtipo IgG1 a IgG2, p. ej. por E233P y/o L234V y/o L235A y/o delección de G236.

Otros ejemplos se refieren a una modificación para reducir la activación sistémica, p. ej. mediante una unión reducida al receptor Fc, tal como D265G y/o A327Q y/o A330A.

20 Otros ejemplos se refieren a una modificación para reducir la inmunogenicidad, p. ej. por un sitio de glucosilación K.O., tal como N297Q, que proporciona una unión deteriorada con el receptor de lectina.

La expresión "formato de anticuerpo" incluirá específicamente el formato de anticuerpo en la forma aislada, quedando entendido en este texto que está sustancialmente libre de otros formatos de anticuerpo dirigidos contra diferentes antígenos diana o que comprende una disposición estructural diferente de los dominios de anticuerpo.
25 También, un formato de anticuerpo aislado como se usa de acuerdo con la invención puede estar comprendido en una preparación de combinación que contiene una combinación del formato de anticuerpo aislado, p. ej. con al menos otro formato de anticuerpo, tal como anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos que tienen diferentes especificidades.

El formato de anticuerpo como se usa en el presente texto puede ser un formato de anticuerpo biespecífico recombinante, término que incluye todos los formatos de anticuerpos que son preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como anticuerpos que se originan de animales, p. ej. mamíferos incluyendo seres humanos, que comprenden genes o secuencias de diferentes orígenes, p. ej. anticuerpos quiméricos, humanizados o anticuerpos derivados de hibridomas. Otros ejemplos se refieren a formatos de anticuerpo aislados de una célula huésped transformada para expresar el formato del anticuerpo, o formatos de
35 anticuerpo aislados de una biblioteca combinatoria recombinante de anticuerpos o dominios de anticuerpos, o formatos de anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique ajuste de secuencias de genes de anticuerpos a otras secuencias de ADN.

Se entiende que la expresión "formato de anticuerpo" incluye derivados del mismo. Un derivado es cualquier combinación de uno o más dominios de anticuerpo o formatos de anticuerpo de la invención y/o una proteína de fusión en la que cualquier dominio del formato de anticuerpo de la invención puede fusionarse en cualquier posición de una o más de otras proteínas, tales como otros anticuerpos o formatos de anticuerpo, por ejemplo una estructura de unión que comprende bucles de CDR, un polipéptido receptor, pero también ligandos, proteínas de andamiaje, enzimas, toxinas y similares. También puede obtenerse un derivado del anticuerpo modular de la invención por asociación o unión a otras sustancias mediante diversas técnicas químicas, tales como acoplamiento covalente, interacción electrostática, enlaces di-sulfuro, etc. Las otras sustancias unidas a las inmunoglobulinas pueden ser
45 lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas o cualquier combinación de las mismas (p. ej. PEG, profármacos o fármacos). En una realización específica de la presente invención, el formato de anticuerpo de la invención es un derivado que comprende una etiqueta adicional que permite la interacción específica con un compuesto biológicamente aceptable. No hay una limitación específica con respecto a la etiqueta utilizable en la presente invención, siempre y cuando no tenga un impacto negativo, o sea tolerable, sobre la unión del formato del anticuerpo a sus dianas. Los ejemplos de etiquetas (*tags*) adecuadas incluyen His-tag, Myc-tag, FLAG-tag, Strep-tag, Calmodulin-tag, GST-tag, BP-tag, y S-tag.
50

El término derivado también incluye fragmentos, variantes, análogos u homólogos de formatos de anticuerpos o formatos de anticuerpos con un patrón de glicosilación específico, p. ej. producidos por glicoingeniería (o glicodiseño), que son funcionales y pueden servir como equivalentes funcionales, p. ej. unión a las dianas específicas y con propiedades funcionales, tales como actividad para dirigirse a las células B, p. ej. actividad apoptótica. Los derivados preferidos son aun funcionalmente activos con respecto a la unión con el antígeno, preferiblemente con una actividad apoptótica.
55

El término "glicodiseñado (*glycoengineered*)" en relación con secuencias de anticuerpos se referirá a variantes de glicosilación que tienen propiedades inmunogénicas modificadas, ADCC y/o CDC como resultado de la glicoingeniería. Todos los anticuerpos contienen estructuras de hidratos de carbono en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada, poseyendo cada isotipo una matriz distinta de estructuras de hidratos de carbono unidos a N, que afectan de forma variable al ensamblaje de proteínas, la secreción o la actividad funcional. Los anticuerpos de tipo IgG1 son glicoproteínas que tienen un sitio de glicosilación unido a N conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos bi-catenarios complejos unidos a Asn297 están sepultados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con la cadena principal del polipéptido, y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie funciones efectoras tales como la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (Lifely, M. R, et al., *Glycobiology* 5: 813 - 822 (1995). La eliminación de N-Glicano en N297, por ejemplo mediante mutación de N297, p. ej. a A, o T299 da como resultado típicamente formatos de anticuerpo aglicosilados con ADCC reducida.

Se presentan diferencias importantes en la glucosilación del anticuerpo entre las líneas celulares, e incluso se observan diferencias menores para una línea celular determinada cultivada en diferentes condiciones de cultivo. La expresión en células bacterianas típicamente proporciona un anticuerpo aglicosilado.

Los formatos de anticuerpo según la presente invención están específicamente desprovistos de un resto Fc activo y por tanto o están compuestos de dominios de anticuerpos que no tienen un sitio de unión a FCGR, incluyendo específicamente cualquier formato de anticuerpo desprovisto de una cadena de dominios CH2 y CH3, o bien comprenden dominios de anticuerpo que carecen de la función efectora Fc, p. ej. mediante modificaciones para reducir las funciones efectoras de Fc, en particular para anular o reducir la actividad de ADCC y/o CDC. Tales modificaciones pueden efectuarse mediante mutagénesis, p. ej. mutaciones en el sitio de unión FCGR o por derivados o agentes para interferir con la actividad ADCC y/o CDC de un formato de anticuerpo, para lograr así la reducción de la función efectora Fc o la carencia de función efectora Fc, que típicamente se entiende que se refiere a la función efectora Fc de menos del 10% del formato no modificado (tipo silvestre), preferiblemente menos del 5%, medido por la actividad de ADCC y/o CDC.

La expresión "trastorno de células B" como se usa en el presente texto se refiere a una diversidad de trastornos, que incluyen, entre otros, tumores malignos de células B, trastornos autoinmunitarios, linfomas de células B, leucemias de células B y otros trastornos. Los ejemplos específicos de trastorno autoinmunitario se eligen entre el grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, esclerodermia, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedad de injerto contra huésped, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo I, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, pénfigo vulgar, vitíligo, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, arteritis de células gigantes, miastenia grave, esclerosis múltiple (MS), preferiblemente MS remitente-recidivante (RRMS), glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, penfigoide bulloso, colitis ulcerosa, síndrome de Guillain-Barré, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome antifosfolípido, narcolepsia, sarcoidosis y granulomatosis de Wegener.

El formato de anticuerpo de acuerdo con la presente invención permite la modulación del repertorio de células B para reducir la autorreactividad de las células B. La modulación es más específica que la lograda por anticuerpos monoespecíficos, ya que solamente se ven afectadas las células B activadas que expresan CD95 y no las células B en reposo que carecen de ella. Se pudo demostrar que el formato de anticuerpo de acuerdo con la invención indujo apoptosis de células B activadas, y la posterior activación suprimida indujo la producción de IgG e inhibió la síntesis de IgG de las células B activadas. Así pues, las células B autorreactivas que producen anticuerpos IgG dirigidos contra dianas autoinmunitarias, tales como autoantígenos, pueden reducirse de una manera efectiva.

Mediante el formato de anticuerpo biespecífico de la presente invención no solo las células B malignas sino también las células B normales (benignas) activadas que expresan el receptor de muerte CD95 podrían ser dirigidas y agotadas. En cambio, las células B en reposo no fueron dirigidas, y no pudo observarse ningún efecto con tales células B normales. Esto indica que las células B activadas son sensibles a CD95 para experimentar muerte celular apoptótica después de la incubación con el formato de anticuerpo de la invención.

Agotar las células B activadas suprime la producción de anticuerpos. Esto resultó sorprendente porque las células productoras de anticuerpos diferenciadas terminalmente, es decir, las células plasmáticas, no expresan CD20. La supresión de las células B precursoras activadas es evidentemente suficiente para suprimir la producción de anticuerpos.

La supresión de la producción de anticuerpos por los formatos de anticuerpo biespecíficos de la invención es preferible al uso de anticuerpos CD20 monoespecíficos establecidos, como rituximab (Rituxan®), que agota todas las células B que expresan CD20, sin diferenciar las células B autorreactivas o activadas de las células B normales o en reposo.

La expresión "sitio de unión", como se usa en el presente texto con respecto a un anticuerpo o formato de anticuerpo de acuerdo con la presente invención, se refiere a una estructura molecular capaz de interacción de unión con un antígeno. Típicamente, el sitio de unión está situado dentro de la región determinante de complementariedad (CDR)

- de un anticuerpo, también denominado en el presente texto "un sitio de unión con CDR", que es una región específica con estructuras variables que confieren función de unión a varios antígenos. Las estructuras variables pueden derivarse de repertorios naturales de anticuerpos, p. ej. repertorios murinos o humanos, o pueden ser producidos por vía recombinante o sintética, p. ej. mediante mutagénesis y específicamente mediante técnicas de aleatorización. Estas incluyen regiones CDR mutagenizadas, regiones de bucle de dominios de anticuerpos variables, en particular bucles CDR de anticuerpos, tales como bucles CDR1, CDR2 y CDR3 de cualquiera de los dominios de anticuerpos VL y/o VH. El formato de anticuerpo como se usa de acuerdo con la invención comprende típicamente uno o más sitios de unión a CDR, cada uno específico para un antígeno.
- El término "específico" o "bienespecífico" como se usa en el presente texto se referirá a una reacción de unión que es determinante del ligando cognado de interés en una población heterogénea de moléculas. Por lo tanto, bajo condiciones designadas, p. ej. condiciones de inmunoensayo, el formato de anticuerpo que se une específicamente a su diana particular no se une en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en una muestra.
- Un sitio de unión específico no tiene típicamente reactividad cruzada con otras dianas. Con todo, el sitio de unión específico puede unirse específicamente a uno o más epítomos, isoformas o variantes de la diana, o puede tener reactividad cruzada con otros antígenos diana relacionados, p. ej. homólogos o análogos.
- La unión específica significa que la unión es selectiva en términos de identidad de la diana, afinidad o avidez de unión alta, media o baja, según se seleccione. La unión selectiva se logra normalmente si la constante de unión o la dinámica de unión es al menos 10 veces diferente, preferiblemente si la diferencia es al menos 100 veces, y más preferiblemente es al menos 1000 veces.
- El formato de anticuerpo bienespecífico de la presente invención comprende específicamente dos sitios con propiedades de unión específicas, en donde dos antígenos diana diferentes son reconocidos por el formato de anticuerpo. Así pues, un ejemplo de formato de anticuerpo bienespecífico puede comprender dos sitios de unión, donde cada uno de los sitios de unión es capaz de unirse específicamente a un antígeno diferente, p. ej. un receptor de muerte y un antígeno de superficie celular de una célula B.
- El término "monovalente" como se usa en el presente texto con respecto a un sitio de unión de un anticuerpo o formato de anticuerpo se referirá a una molécula que comprende solamente un sitio de unión dirigido contra un antígeno diana. El término "valencia" se entiende entonces como el número de sitios de unión dirigidos contra el mismo antígeno diana, uniéndose específicamente al mismo epítomo o bien a diferentes epítomos de un antígeno.
- Se entiende que el formato de anticuerpo de la presente invención comprende un sitio de unión monovalente que se une específicamente a una diana de receptor de muerte y otro sitio de unión monovalente para unirse específicamente a un antígeno de superficie celular expresado en células B, en particular células B autorreactivas.
- El término "antígeno" como se usa en el presente texto indistintamente con los términos "diana" o "antígeno diana" se referirá a una molécula diana completa o a un fragmento de tal molécula reconocido por un sitio de unión de anticuerpo. Específicamente, las subestructuras de un antígeno, p. ej. una estructura de polipéptido o carbohidrato, generalmente denominada "epítomos", p. ej. los epítomos de las células B o el epítomo de células T, que son inmunológicamente relevantes, pueden reconocerse por tal sitio de unión. El término "epítomo" como se usa en el presente texto se referirá en particular a una estructura molecular que puede constituir completamente un compañero de unión específico o ser parte de un compañero de unión específico a un sitio de unión de un formato de anticuerpo de la presente invención. Un epítomo puede estar compuesto por un carbohidrato, una estructura peptídica, un ácido graso, una sustancia orgánica, bioquímica o inorgánica o derivados de los mismos y cualquier combinación de los mismos. Si un epítomo está comprendido en una estructura peptídica, tal como un péptido, un polipéptido o una proteína, incluirá normalmente al menos 3 aminoácidos, preferiblemente de 5 a 40 aminoácidos, y más preferiblemente entre aproximadamente 10 y 20 aminoácidos. Los epítomos pueden ser epítomos lineales o bien conformacionales. Un epítomo lineal está formado por un único segmento de una secuencia primaria de una cadena de polipéptido o carbohidrato. Los epítomos lineales pueden ser contiguos o solapantes. Los epítomos conformacionales están compuestos de aminoácidos o carbohidratos reunidos por plegamiento del polipéptido para formar una estructura terciaria y los aminoácidos no son necesariamente adyacentes entre sí en la secuencia lineal.
- La expresión "antígeno de superficie celular" con respecto a una célula B como se usa en el presente texto se referirá a un antígeno expresado en la superficie de una célula B, preferiblemente una célula B madura, activada o autorreactiva, que puede ser dirigida con un antagonista que se une al mismo. El CD20 se considera un ejemplo de marcador de superficie de las células B dirigido por el formato de anticuerpo de la presente invención.
- Un sitio de unión que se une específicamente a CD20 puede derivarse de un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente dirigido contra el antígeno, p. ej. rituximab u orelizumab dirigidos contra CD20. Específicamente, se puede usar un sitio de unión derivado de cualquiera de los formatos de anticuerpo anti-CD20 como se ejemplifica en la Figura 2.
- El término "CD20" incluye cualquier variante, isoforma y homólogo de especie del CD20 humano que se expresan naturalmente por células o se expresan en células transfectadas con el gen CD20.

La expresión "receptor de muerte" utilizado en el presente texto indistintamente con el término "CD95" como se usa en la presente memoria se referirá a un antígeno derivado de un receptor en la superficie de las células que conduce a la muerte celular programada por una o más rutas de apoptosis. Resultó que al contrario que las células B activadas, el CD95 no se expresa en las células B en reposo normales.

5 El CD95 también se conoce como Fas o Apo-1, y es miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral. Un sitio de unión que se une específicamente a CD95 puede derivarse de anticuerpos dirigidos a CD95, tales como los clones APO-1 o LT95 y DX 2 distribuidos por Acris Antibodies, Herford, Alemania. Concretamente se puede usar un sitio de unión derivado de cualquiera de los formatos de anticuerpo anti-CD95 como se ejemplifica en la Figura 2.

10 El término "CD95" incluye cualquier variante, isoforma y homólogos de especie de CD95 humano que se expresan naturalmente por células o se expresan en células transfectadas con el gen CD95.

El término "variantes" se referirá a mutantes, p. ej. obtenidos por métodos de mutagénesis dirigida al sitio, en particular para eliminar, intercambiar, introducir insertos en una región de anticuerpo específica o derivatizar químicamente una secuencia de aminoácidos, en los dominios constantes para diseñar la función efectora o vida
 15 mitad del anticuerpo, o en los dominios variables para mejorar las propiedades de unión con el antígeno, por ejemplo mediante técnicas de maduración de afinidad. Puede emplearse cualquiera de los métodos de mutagénesis conocidos, incluidas las mutaciones puntuales en las posiciones deseadas, p. ej. obtenidas por técnicas de aleatorización. En algunos casos, las posiciones se eligen al azar, p. ej. con cualquiera de los posibles aminoácidos o bien una selección de aminoácidos preferidos para aleatorizar las secuencias del anticuerpo. El término "variante"
 20 comprenderá específicamente variantes funcionalmente activas.

La expresión "variante funcionalmente activa" de una molécula, tal como el anticuerpo que se usa en este texto, significa una secuencia que resulta de la modificación de esta secuencia (una secuencia parental) por inserción, deleción o sustitución de uno o más aminoácidos, o derivatización química de uno o más restos de aminoácidos, o
 25 nucleótidos dentro de la secuencia o en uno o en los dos extremos distales de la secuencia, y la cual modificación no afecta (en particular no deteriora) a la actividad de esta secuencia. En el caso de un sitio de unión que tiene especificidad para un antígeno diana seleccionado, la variante funcionalmente activa de una molécula aún tendría la especificidad de unión predeterminada, esto podría cambiarse, p. ej. para cambiar la especificidad fina a un epítipo específico, la afinidad, la avidéz, la relación de K_{on} o K_{off} , etc.

Pueden obtenerse variantes funcionalmente activas cambiando la secuencia de un formato de anticuerpo parental, p. ej. cualquiera de las secuencias de la Figura 2, p. ej. las secuencias NA-C20 o Novotarg de la Figura 2E i) o ii), y
 30 están caracterizadas por tener una actividad biológica similar a la mostrada por la secuencia respectiva, que incluye la capacidad de unirse a CD20 y/o CD95 o de dirigirse a la diana activada o células B auto-reactivas.

La variante funcionalmente activa del formato de anticuerpo tiene preferiblemente en forma sustancial la misma actividad biológica, como se determina por un ensayo de unión específica o prueba funcional para dirigir células B
 35 activadas o autorreactivas. La expresión "sustancialmente la misma actividad biológica" como se usa en el presente texto se refiere a la actividad como se indica por sustancialmente la misma actividad que es al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o incluso al menos 100% o al menos 110%, o al menos 120%, o al menos 130%, o al menos 140%, o al menos 150%, o al menos 160% , o al menos 170%, o al menos 180%, o al menos 190%, por ejemplo hasta 200% de la actividad como se determina para
 40 el formato de anticuerpo parental, p. ej. el formato de anticuerpo biespecífico recombinante NA-C20 o Novotarg de la Figura 2E.

En una realización preferida, la variante funcionalmente activa

a) es un fragmento biológicamente activo de la molécula, comprendiendo el fragmento al menos 50% de la secuencia de la molécula, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, aún más
 45 preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 97%, 98% o 99%;

b) se deriva de la molécula mediante al menos una sustitución, adición y/o eliminación de aminoácidos, donde la variante funcionalmente activa tiene una identidad de secuencia con la molécula o parte de ella, tal como un anticuerpo de al menos 50% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al
 50 menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 97%, 98% o 99%; y/o

c) consiste en la molécula o una variante funcionalmente activa de la misma y adicionalmente al menos un aminoácido o nucleótido heterólogo respecto al polipéptido o la secuencia de nucleótidos, preferiblemente donde las
 55 variantes funcionalmente activas se derivan de cualquiera de los anticuerpos de origen natural o recombinante anti-CD19, anti-CD20, anti-CD40 y/o anti-CD95.

En una realización preferida de la invención, la variante funcionalmente activa del anticuerpo de acuerdo con la invención es esencialmente idéntica a la variante descrita anteriormente, pero difiere de su polipéptido o de la

secuencia de nucleótidos, respectivamente, en que se deriva de una secuencia homóloga de una especie diferente. Estos se conocen como variantes de origen natural.

La invención proporciona específicamente secuencias quiméricas, humanizadas o humanas y variantes funcionalmente activas de un formato de anticuerpo parental que comprende tales secuencias quiméricas, humanizadas o humanas.

El término "quimérico", como se usa con respecto a un formato de anticuerpo de la invención, se refiere a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras es homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase particular, mientras que el segmento restante de la cadena es homólogo a las secuencias correspondientes en otra especie o clase. Típicamente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a secuencias de anticuerpos derivados de otra. Por ejemplo, la región variable puede derivarse de fuentes conocidas actualmente que usan células B fácilmente disponibles o hibridomas de organismos hospedadores no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas.

El término "humanizado", como se usa con respecto a un formato de anticuerpo de la invención, se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión con el antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, donde el resto de la estructura de inmunoglobulina de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión al antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados sobre dominios constantes o solamente las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión al antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados, p. ej. por una o más sustituciones de aminoácidos, preferiblemente modificados para parecerse más estrechamente a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados preservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo humanizado de ratón que contiene las seis CDRs del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDRs que están alteradas con respecto al anticuerpo original.

Se entiende que el término "humano" como se usa en el presente texto con respecto a un formato de anticuerpo de la presente invención incluye anticuerpos que tienen regiones variable y constante derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los formatos de anticuerpo humano de la presente invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej. mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en los CDRs. Los formatos de anticuerpo humanos de la invención incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas.

La expresión "variante funcionalmente activa" incluye también variantes alélicas de origen natural, así como mutantes o cualquier otra variante de origen no natural. Como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de un (poli) péptido que se caracteriza por tener una sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos que esencialmente no altera la función biológica del polipéptido.

Las variantes funcionalmente activas se pueden obtener mediante alteraciones de secuencia en el polipéptido o en la secuencia de nucleótidos, p. ej. mediante una o más mutaciones puntuales, en donde las alteraciones de secuencia conservan una función del polipéptido inalterado o la secuencia de nucleótidos, cuando se usan en combinación con la invención. Tales alteraciones de secuencia pueden incluir, pero no se limitan a ellas, sustituciones (conservadoras), adiciones, delecciones, mutaciones e inserciones.

Una variante de CDR incluye una secuencia de aminoácidos modificada por al menos un aminoácido, en donde dicha modificación puede ser química o una alteración parcial de la secuencia de aminoácidos, la cual modificación permite que la variante retenga las características biológicas de la secuencia no modificada. Por ejemplo, la variante es una variante funcional que se une a CD19, CD20, CD40 o CD95. Una alteración parcial de la secuencia de aminoácidos de CDR puede ser por delección o sustitución de uno a varios aminoácidos, p. ej. 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o por adición o inserción de uno a varios aminoácidos, p. ej. 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o mediante una derivatización química de uno a varios aminoácidos, p. ej. 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o una combinación de los mismos. Las sustituciones en restos de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras, por ejemplo sustituyendo un aminoácido hidrófobo por un aminoácido hidrófobo alternativo.

Las sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y en sus propiedades químicas. Ejemplos de tales familias son aminoácidos con cadenas laterales básicas, con cadenas laterales ácidas, con cadenas laterales alifáticas no polares, con cadenas laterales aromáticas no polares, con cadenas laterales polares no cargadas, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales grandes, etc.

Una mutación puntual se entiende en particular como la ingeniería de un polinucleótido que da como resultado la expresión de una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos no modificada por

ingeniería en la sustitución o intercambio, delección o inserción de uno o más elementos simples (no consecutivos) o dobles de aminoácidos para diferentes aminoácidos.

5 Las mutaciones puntuales preferidas se refieren al intercambio de aminoácidos con la misma polaridad y/o carga. En relación con esto, los aminoácidos se refieren a veinte aminoácidos naturales codificados por sesenta y cuatro codones triplete. Estos 20 aminoácidos se pueden dividir en aquellos que tienen cargas neutras, cargas positivas y cargas negativas.

Los aminoácidos "neutros" se muestran a continuación junto con su respectivo código de tres letras y una sola letra, y polaridad:

Alanina: (Ala, A) no polar, neutro;

10 Asparagina: (Asn, N) polar, neutro;

Cisteína: (Cys, C) no polar, neutro;

Glutamina: (Gln, Q) polar, neutro;

Glicina: (Gly, G) no polar, neutro;

Isoleucina: (Ile, I) no polar, neutro;

15 Leucina: (Leu, L) no polar, neutro;

Metionina: (Met, M) no polar, neutro;

Fenilalanina: (Phe, F) no polar, neutro;

Prolina: (Pro, P) no polar, neutro;

Serina: (Ser, S) polar, neutro;

20 Treonina: (Thr, T) polar, neutro;

Triptófano: (Trp, W) no polar, neutro;

Tirosina: (Tyr, Y) polar, neutro;

Valina: (Val, V) no polar, neutro; y

Histidina: (His, H) polar, positivo (10%) neutro (90%).

25 Los aminoácidos cargados "positivamente" son:

Arginina: (Arg, R) polar, positiva; y

Lisina: (Lys, K) polar, positiva.

Los aminoácidos cargados "negativamente" son:

Ácido aspártico: (Asp, D) polar, negativo: y

30 Ácido glutámico: (Glu, E) polar, negativo.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias polipeptídicas identificadas en la presente memoria se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica específica, después del alineamiento de la secuencia y de la introducción de huecos, si fuese necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

40 El término "sujeto" como se usa en la presente memoria se referirá a un mamífero de sangre caliente, en particular un ser humano. Concretamente, el formato de uso médico de la invención o el método de tratamiento correspondiente son válidos para un sujeto que necesita profilaxis o tratamiento de un trastorno de las células B o un estado patológico asociado con un trastorno de las células B. El sujeto puede ser un paciente que sufre una enfermedad en etapa temprana o en etapa tardía, o si no un sujeto predispuesto a dicha enfermedad, p. ej. por predisposición genética.

De acuerdo con una realización específica, los formatos de anticuerpo de la invención tienen actividad apoptótica, es decir, actividad citotóxica directa contra las células B diana independientemente de las células inmunoefectoras, tales como las células NK. Específicamente, los formatos de anticuerpo de la invención tienen actividad apoptótica, como se mide en un ensayo de apoptosis estándar, p. ej. como se mide en un ensayo de fragmentación de ADN estándar.

La actividad apoptótica se mide preferiblemente usando métodos estándar para determinar células moribundas y/o muertas. Para medir la apoptosis se pueden emplear ensayos de citotoxicidad. Estos ensayos pueden ser ensayos radioactivos y no radioactivos que miden los aumentos de la permeabilidad de la membrana plasmática, ya que las células moribundas se vuelven porosas, o ensayos colorimétricos que miden la reducción en la actividad metabólica de las mitocondrias. Las mitocondrias en las células muertas no pueden metabolizar los colorantes, mientras que las mitocondrias de las células vivas sí que pueden.

También se pueden medir indicadores precoces para la apoptosis, tales como alteraciones en la asimetría de la membrana que dan como resultado la aparición de fosfatidilserina en el exterior de la superficie de la célula (ensayos basados en anexina V). Alternativamente, las etapas tardías de la apoptosis, como la activación de las caspasas, pueden medirse en poblaciones de células o en células individuales. Además, se puede determinar la medición de la liberación de citocromo C y AIF en el citoplasma por mitocondrias o la fragmentación del ADN cromosómico.

El marcado de final de corte de dUTP de desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) es un método común para detectar la fragmentación del ADN que resulta de las cascadas de señalización apoptótica. El ensayo se basa en la presencia de mellas en el ADN que pueden identificarse mediante la desoxinucleotidiltransferasa terminal, una enzima que catalizará la adición de dUTPs bromolados que son detectados de forma secundaria con un anticuerpo marcado específico.

La actividad apoptótica preferida del formato de anticuerpo según la invención llega al menos a un 20% de citólisis, preferiblemente al menos un 30%, más preferiblemente al menos 40%, incluso más preferiblemente al menos 50%, como se mide en un correspondiente ensayo de destrucción celular *ex vivo*; p. ej. midiendo la supervivencia de las células B después de la incubación con anticuerpos biespecíficos mediante citometría de flujo.

Específicamente, el formato del anticuerpo de la presente invención carece de la función efectora Fc y no tendría una actividad citotóxica significativa en presencia de células inmunoefectoras, como se mide en un ensayo estándar de ADCC o CDC, p. ej. empleando células que expresan la diana del receptor en la superficie celular.

La baja actividad citotóxica determinada por cualquiera de los ensayos ADCC o CDC puede mostrarse para cualquier formato de anticuerpo de la invención, si no hay un aumento significativo en el porcentaje de citólisis en comparación con un control. La falta de función efectora Fc típicamente se determina si la actividad citotóxica medida por el aumento porcentual absoluto de la actividad de ADCC y/o CDC es preferiblemente inferior al 10%, preferiblemente inferior al 5%, más preferiblemente inferior al 3%.

Preferiblemente, se usa un formato de anticuerpo que se une a uno o a los dos antígenos diana con una alta afinidad, en particular con una tasa alta y/o baja, o una alta avidéz de unión. La afinidad de unión de un anticuerpo se caracteriza normalmente en términos de concentración del anticuerpo a la que están ocupados la mitad de los sitios de unión con el antígeno, conocida como constante de disociación (K_d o KD). Habitualmente, un aglutinante se considera un aglutinante de alta afinidad con una $K_d < 10^{-8}$ M, preferiblemente una $K_d < 10^{-9}$ M, incluso más preferiblemente una $K_d < 10^{-10}$ M.

Sin embargo, en una realización preferida alternativamente, las afinidades de unión al antígeno individual son de afinidad media, p. ej. con una K_d inferior a 10^{-6} M y hasta 10^{-8} M, p. ej. cuando se une al menos a dos antígenos.

Los formatos de anticuerpo monoclonal biespecífico de la invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas, incluyendo la tecnología de anticuerpos recombinantes, empleando opcionalmente hibridomas o secuencias de bibliotecas de secuencias de anticuerpos humanos. Se prefiere la tecnología de anticuerpos recombinantes porque permite la producción reproducible por células transfectadas y la purificación simplificada.

Los formatos de anticuerpos de la presente invención se proporcionan específicamente en una composición farmacéutica. Se contemplan composiciones farmacéuticas en donde se formulan el formato de anticuerpo de la presente invención y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones estables de los formatos de anticuerpo de la presente invención se preparan para el almacenamiento opcionalmente mezclando el formato de anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables farmacéuticamente, en forma de formulaciones liofilizadas, soluciones acuosas o emulsiones de aceite en agua.

Típicamente, tales composiciones comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable como se conoce y es exigido por la práctica farmacéutica aceptable, véase p. ej. Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16ª edición (1980) Mack Publishing Co. Los ejemplos de tales vehículos incluyen vehículos esterilizados tales como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, opcionalmente tamponadas con tampones adecuados a un pH dentro del intervalo de 5 a 8.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* necesitarán ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos adecuados.

5 La administración de la composición farmacéutica que comprende los formatos de anticuerpos de la presente invención puede hacerse de diversas formas, que incluyen administración sistémica o parenteral, preferiblemente en forma de solución acuosa estéril, p. ej. por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea, pero también por vía oral, intranasal, intraóptica, transdérmica, mucosal, tópica (p. ej. geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, parenteral, rectal o intraocular. Así pues, la invención proporciona el formato de anticuerpo en una formulación correspondiente adecuada para tal uso.

10 La presente invención incluye un preparado farmacéutico, que contiene como sustancia activa los formatos de anticuerpo de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva. En particular, una formulación aceptable farmacéuticamente del formato de anticuerpo es compatible con el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

15 La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva", usada en el presente texto indistintamente con cualquiera de las expresiones "cantidad efectiva" o "cantidad suficiente" del formato de anticuerpo de la presente invención, es una cantidad o actividad suficiente para que, cuando se administra al sujeto, tenga por resultado un efecto beneficioso o deseado, incluyendo los resultados clínicos y, como tal, una cantidad efectiva o sinónimo de ella depende del contexto en el que se aplica. En el contexto de la enfermedad, pueden usarse cantidades terapéuticamente efectivas del formato del anticuerpo para tratar, modular, atenuar, revertir o afectar a una enfermedad o afección que se beneficia de una regulación a la baja o una reducción del exceso de células B, p. ej. para la inhibición de reacciones autoinmunitarias, por ejemplo enfermedades inflamatorias agudas o crónicas asociadas con un trastorno de células B autorreactivas. Se pretende que una cantidad efectiva signifique la cantidad de un compuesto que es suficiente para tratar, prevenir o inhibir tales enfermedades o trastornos. La cantidad de formato de anticuerpo que corresponderá a tal cantidad variará dependiendo de varios factores, tales como el fármaco o compuesto dados, la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de enfermedad o trastorno, la identidad del sujeto o del hospedador que se está tratando, y similares, pero que puede ser determinado rutinariamente por un experto en la técnica.

25 Además, un régimen de tratamiento o prevención de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz del formato de anticuerpo de la presente invención puede consistir en una administración única, o comprender alternativamente una serie de aplicaciones. Por ejemplo, el formato de anticuerpo puede ser administrado al menos una vez al año, al menos una vez cada medio año o al menos una vez al mes. Sin embargo, en otra realización, el formato de anticuerpo puede administrarse al sujeto entre aproximadamente una vez por semana y aproximadamente una administración diaria para un tratamiento dado. La duración del período de tratamiento depende de diversos factores, como la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, la concentración y la actividad del formato de anticuerpo. También se apreciará que la dosificación efectiva utilizada para el tratamiento o la profilaxis puede aumentar o disminuir en el curso de un régimen particular de tratamiento o profilaxis. Pueden resultar cambios en la dosificación y hacerse evidentes mediante ensayos estándar de diagnóstico conocidos en la técnica. En algunos casos, puede requerirse una administración crónica.

30 Una cantidad terapéuticamente efectiva del formato de anticuerpo tal como se proporciona a un paciente humano en necesidad del mismo puede estar concretamente en el intervalo de 0,5 a 500 mg, preferiblemente de 1 a 400 mg, incluso más preferiblemente hasta 300 mg, hasta 200 mg, hasta 100 mg o hasta 10 mg, aunque pueden ser indicadas dosis más altas, p. ej. para el tratamiento de condiciones de enfermedades agudas.

35 Los ejemplos de formulaciones como se usan para administración parenteral incluyen las que son adecuadas para inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril.

45 En una realización, el formato de anticuerpo de acuerdo con la presente invención es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente, p. ej. como una monoterapia de modificación de una enfermedad.

Alternativamente, el formato de anticuerpo de acuerdo con la presente invención es administrado en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos incluyendo, pero sin limitarse a ellos, tratamientos estándar, p. ej. quimioterapia en casos de enfermedad maligna, o interferón beta o esteroides en caso de MS, o inmunoglobulinas en dosis elevadas en caso de ITP.

50 Una terapia de combinación está empleando en particular un régimen estándar, p. ej. como el usado para tratar RRMS. Esto puede incluir interferón beta o esteroides.

En una terapia de combinación, el formato de anticuerpo se puede administrar como una mezcla, o de forma conjunta con uno o más regímenes terapéuticos distintos, p. ej. antes, simultáneamente o después de la terapia concomitante.

55 Las propiedades biológicas del formato de anticuerpo de acuerdo con la invención se pueden caracterizar *ex vivo* en experimentos con células, tejidos y organismos completos. Como es sabido en la técnica, los fármacos se prueban con frecuencia *in vivo* en animales, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, ratones, ratas, conejos, perros, gatos,

cerdos y monos, para medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o un modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, la farmacodinámica, la toxicidad y otras propiedades de un fármaco. Los animales pueden denominarse modelos de enfermedad. Los productos terapéuticos se prueban con frecuencia en ratones, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, ratones lampiños o atímicos, ratones SCID, ratones xenoinjertados y ratones transgénicos (que incluyen ratones *knockin* y *knockout*). Tal experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial del formato de anticuerpo a usar como un agente terapéutico con la vida mitad apropiada, la función efectora, la actividad apoptótica y la actividad inhibidora de IgG. Cualquier organismo, preferiblemente mamíferos, se puede usar para las pruebas. Por ejemplo, a causa de su similitud genética con seres humanos, primates y monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados y por tanto pueden usarse para probar la eficacia, toxicidad, farmacocinética, farmacodinámica, vida mitad u otras propiedades del formato de anticuerpo según la invención. Al final, se requieren pruebas de las sustancias en seres humanos para su aprobación como medicamentos, y estos experimentos se contemplan en el presente texto. Así pues, el formato de anticuerpo de la presente invención puede probarse en modelos animales o en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, su toxicidad, su inmunogenicidad, su farmacocinética y/o otras propiedades clínicas.

Los métodos para producir y caracterizar un anticuerpo de acuerdo con la invención son bien conocidos en la técnica. En una realización preferida, se producen y se criban variantes de anticuerpo en relación con propiedades predefinidas usando uno o más ensayos basados en células, que emplean células que expresan el formato de anticuerpo de la invención o ensayos *in vivo*. Tales ensayos implican a menudo monitorizar la respuesta de las células al anticuerpo, por ejemplo, supervivencia celular, muerte celular, cambio en la morfología celular o activación transcripcional, tal como expresión celular de un gen natural o gen informador.

Estos ensayos típicamente se basan en la función del formato del anticuerpo; es decir, la capacidad del formato de anticuerpo para unirse a los antígenos diana, p. ej. en la misma célula, y mediar algún evento bioquímico, por ejemplo la apoptosis o inhibición de dichas células, p. ej. en un ensayo de unión competitiva, la inhibición de la unión con células B o la reducción de la expresión de IgG en presencia o ausencia del anticuerpo de la invención.

Los métodos para controlar la muerte o la viabilidad celular son conocidos en la técnica e incluyen el uso de colorantes, reactivos inmunoquímicos, citoquímicos y radiactivos. Por ejemplo, los ensayos de tinción con caspasa pueden permitir que se mida la apoptosis, y la absorción o liberación de sustratos radioactivos o tintes fluorescentes tales como azul alamar puede permitir la monitorización del crecimiento o la activación celular.

La activación transcripcional puede servir también como método para analizar la función en ensayos basados en células. En este caso, la respuesta puede monitorizarse ensayando genes naturales o inmunoglobulinas que pueden regularse al alza, por ejemplo puede medirse la liberación de ciertas interleucinas, o alternativamente la lectura puede ser a través de una construcción reportera. Los ensayos basados en células pueden implicar también la medida de los cambios morfológicos de las células como respuesta a la presencia de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

La producción recombinante del formato de anticuerpo de la invención emplea preferiblemente un sistema de expresión, que incluye p. ej. construcciones de expresión o vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica el formato de anticuerpo.

El término "sistema de expresión" se refiere a moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia codificadora deseada y secuencias de control en enlace operativo, de modo que los hospedadores transformados o transfectados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para efectuar la transformación, el sistema de expresión se puede incluir en un vector; sin embargo, el ADN relevante puede también integrarse en el cromosoma del hospedador. Alternativamente, se puede usar un sistema de expresión para la transcripción/traducción *in vitro*.

Las "construcciones de expresión" o "vectores" usados en el presente texto se definen como secuencias de ADN que se requieren para la transcripción de secuencias de nucleótidos recombinantes clonadas, es decir, de genes recombinantes y la traducción de su RNAm en un organismo hospedador adecuado. Los vectores de expresión comprenden la casete de expresión y adicionalmente suelen comprender un origen para la replicación autónoma en las células hospedadoras o un sitio de integración al genoma, uno o más marcadores seleccionables (p. ej. un gen de síntesis de aminoácido o un gen que confiere resistencia a antibióticos tales como zeocina, kanamicina, G418 o higromicina), varios sitios de segmentación de enzimas de restricción, una secuencia de promotor adecuada y un terminador de la transcripción, los cuales componentes están ligados operativamente. Los términos "plásmido" y "vector" como se usan en el presente texto incluyen secuencias de nucleótidos así como secuencias de nucleótidos integrantes del genoma.

Específicamente, el término se refiere a un vehículo por el cual una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo un gen extraño), p. ej. una secuencia de nucleótidos que codifica el formato de anticuerpo de la presente invención, se puede introducir en una célula hospedadora, para transformar el huésped y promover la expresión (p. ej. transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los plásmidos son los vectores preferidos de la invención.

Los vectores comprenden típicamente el ADN de un agente transmisible, en el que se inserta ADN extraño. Una forma común de insertar un segmento de ADN en otro segmento de ADN implica el uso de enzimas llamadas enzimas de restricción que segmentan el ADN en sitios específicos (grupos específicos de nucleótidos) llamados sitios de restricción. Un "casete" se refiere a una secuencia de codificación de ADN o segmento de ADN que codifica un producto de expresión que puede insertarse en un vector en sitios de restricción definidos. Los sitios de restricción del casete están diseñados para asegurar la inserción del casete en el marco de lectura apropiado. Generalmente, el ADN extraño se inserta en uno o más sitios de restricción del ADN del vector, y luego es transportado por el vector a una célula huésped junto con el ADN del vector transmisible. Un segmento o secuencia de ADN que tiene ADN insertado o añadido, tal como un vector de expresión, también se puede llamar una "construcción de ADN". Un tipo común de vector es un "plásmido", que generalmente es una molécula autocontenida de ADN bicatenario que puede aceptar fácilmente ADN (extraño) adicional y que puede introducirse fácilmente en una célula hospedadora adecuada. Un vector de la invención contiene con frecuencia ADN codificador y secuencias de control de la expresión, p. ej. ADN promotor, y tiene uno o más sitios de restricción adecuados para insertar ADN extraño. ADN codificador es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos en particular para un polipéptido o proteína en particular, tal como un formato de anticuerpo de la invención. El ADN promotor es una secuencia de ADN que inicia, regula o media o controla de alguna otra forma la expresión del ADN codificador. El ADN promotor y el ADN codificador pueden ser del mismo gen o de genes diferentes, y pueden ser del mismo organismo o de organismos distintos. Los vectores de clonación recombinantes de la invención incluirán con frecuencia uno o más sistemas de replicación para clonación o expresión, uno o más marcadores para selección en el hospedador, p. ej. resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión.

Los procedimientos utilizados para ligar secuencias de ADN, p. ej. proporcionar o codificar los factores de la presente invención y/o el POI, un promotor, un terminador y más secuencias, respectivamente, e insertarlas en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la integración o replicación del hospedador, son bien conocidos por las personas expertas en la técnica, p. ej. como se describe en J. Sambrook y otros, "Molecular Cloning 2^a ed.", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

La expresión "línea celular", como se usa en el presente texto, se refiere a un clon establecido de un tipo particular de célula que ha adquirido la capacidad de proliferar a lo largo de un período prolongado de tiempo. La expresión "línea celular hospedadora" se refiere a una línea de células que se usa para expresar un gen endógeno o recombinante para producir polipéptidos, tal como el formato de anticuerpo recombinante de la invención. Se entiende generalmente que una "línea de células hospedadoras de producción" o "línea de células de producción" es una línea celular lista para ser usada para el cultivo en un biorreactor con el fin de obtener el producto de un proceso de producción, el formato de anticuerpo recombinante de la invención.

Se conoce específicamente una célula hospedadora como una célula o línea de células recombinantes transfectada con una construcción de expresión, tal como un vector de acuerdo con la invención.

El término "recombinante" como se usa en el presente texto significará "que está preparado por ingeniería genética" o "el resultado de ingeniería genética", p. ej. empleando específicamente secuencias heterólogas incorporadas en un vector recombinante o célula hospedadora recombinante.

Un formato de anticuerpo monoclonal biespecífico de la invención puede producirse usando cualquier sistema de expresión conocido y bien establecido, y tecnología de cultivo de células recombinantes, por ejemplo, mediante expresión en hospedadores bacterianos (sistemas procariotas) o sistemas eucariotas tales como levaduras, hongos, células de insectos o células de mamíferos. Una molécula de anticuerpo de la presente invención se puede producir en organismos transgénicos tales como una cabra, una planta o un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón modificada genéticamente que tiene grandes fragmentos de los *loci* de inmunoglobulina humana y es deficitaria en la producción de anticuerpos de ratón. También puede producirse un anticuerpo por síntesis química.

De acuerdo con una realización específica, la célula hospedadora es una línea celular de producción de células seleccionadas en el grupo formado por CHO, PerC6, CAP, HEK, HeLa, NSO, SP2/0, hibridoma y Jurkat. Más específicamente, la célula hospedadora se obtiene a partir de células CHO-K1, CHO-DG44 o CHO-S.

Las células de ovario de hámster chino (CHO) se han usado con la mayor frecuencia para la producción de anticuerpos. Además de proporcionar patrones de glicosilación adecuados, estas células permiten la generación constante de líneas celulares clonales altamente productivas genéticamente estables. Se pueden cultivar a densidades elevadas en biorreactores simples utilizando medios libres de suero, y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles.

La célula hospedadora de la invención se cultiva específicamente o se mantiene en un cultivo libre de suero que comprende p. ej. otros componentes, como proteínas plasmáticas, hormonas y factores de crecimiento, como una alternativa al suero.

Las células hospedadoras son las más preferidas, cuando se establecen, se adaptan y se cultivan completamente bajo condiciones libres de suero, y opcionalmente en medios que están libres de cualquier proteína/péptido de origen animal.

La descripción precedente se entenderá mejor con referencia a los ejemplos que siguen. Sin embargo, tales ejemplos son meramente representativos de métodos para llevar a la práctica una o más realizaciones de la presente invención y no deben considerarse como limitantes del alcance de la misma.

Ejemplos.

- 5 Ejemplo 1: Producción de la formación de anticuerpos biespecíficos con especificidad para CD20 y CD95.

Versión quimérica (denominada NA-C20).

10 Las secuencias de aminoácidos que codifican la cadena ligera quimérica (anti CD95-VJ/CL humano de ratón, SEC ID 21) y la cadena pesada quimérica (anti CD95-VDJ/CH1 humano/bisagra/ modificado CH2/anti CD20 VHVL de ratón, SEC ID 23) fueron expresadas con éxito en una línea de células SP2/0. Las proteínas están codificadas por las secuencias de nucleótidos SEC ID 22 y SEC ID 25, que se ensamblaron correctamente para formar dicho derivado de anticuerpo anti CD95XCD20 biespecífico. Esto se confirmó por detección con anticuerpos específicos para IgG1 humana y cadena ligera kappa humana en inmunotransferencia western. La proteína para la caracterización adicional se purificó a partir del sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía de afinidad (CptoL, GE Healthcare).

- 15 *Versión humanizada (denominada Novotarg).*

20 Las secuencias de aminoácidos que codifican CD95-VJ humanizado/CL humano (SEC ID 26) y CD95-VDJ-CH1-H-CH humanizado/CD20scFv humanizado (SEC ID 28) se tradujeron inversamente en secuencias nt y fueron codón-optimizadas para *Cricetulus griseus*. Las correspondientes secuencias de nucleótidos se listan como SEC ID 27 y SEC ID 29. Se diseñaron genes sintéticos, se sintetizaron y se clonaron en un vector de expresión apropiado para la transfección de una línea celular hospedadora de ovario de hámster chino (CHO). Ambas secuencias se expresaron y se ensamblaron con éxito para formar dicho derivado de anticuerpo biespecífico. Esto se confirmó por detección con anticuerpos específicos para IgG1 humana y cadena ligera kappa humana en inmunotransferencia western. La proteína para la caracterización adicional se purificó a partir del sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía de afinidad (CptoL, GE Healthcare).

- 25 Ejemplo 2: caracterización de la formación de anticuerpos biespecíficos con especificidad para CD20 y CD95.

Afinidad de unión del derivado de anticuerpo CD95XCD20 quimérico hacia CD95 y CD20.

30 La unión con éxito del derivado de anticuerpo CD95XCD20 quimérico hacia sus dianas se confirmó mediante citometría de flujo (BD FACS Calibur). Una línea celular de linfoblastos B CD20⁺CD95⁺ (Daudi) y una línea celular de glioma CD20⁺CD95⁺ (LN-18) fueron incubadas con una dilución en serie del derivado de anticuerpo quimérico (2 x 10⁶ células/muestra en PBS 1% de FCS 0,01% de NaN₃, 1 h a 4 °C), respectivamente. La proteína unida se detectó con un anticuerpo específico de Fcy antihumano de cabra marcado con PE (Jackson Immuno Research n° cat. 109 - 116 - 098, 1: 200, 30 min a 4 °C). Un aumento dependiente de la concentración en la intensidad fluorescente media (MFI) ratificó la unión con éxito del anticuerpo biespecífico quimérico a CD20 así como a CD95 (FIG. 3).

Afinidad de unión del derivado de anticuerpo CD95XCD20 humanizado hacia CD95 y CD20.

35 La unión con éxito del derivado de anticuerpo CD95XCD20 humanizado hacia sus dianas se confirmó mediante citometría de flujo (BD FACS Calibur). Se incubaron una línea celular de linfoblastos B CD20⁺CD95⁺ (Daudi) y una línea celular de glioma CD20⁺CD95⁺ (LN-18), con una dilución en serie del derivado de anticuerpo quimérico (2 x 10⁶ células/muestra en PBS 1% de FCS 0,01% de NaN₃, 1 h a 4 °C), respectivamente. La proteína unida se detectó con un anticuerpo específico de Fcy antihumano de cabra marcado con PE (Jackson Immuno Research cat. n.º 109-116-098, 1: 200, 30 min a 4 °C). Un aumento dependiente de la concentración en la intensidad fluorescente media (MFI) ratificó la unión con éxito del anticuerpo biespecífico humanizado a CD20 así como a CD95 (FIG. 4).

Vida mitad in vivo del derivado de anticuerpo CD95XCD20 quimérico.

45 Ratonos C57BL6 (machos, 6 semanas de edad, n = 3) recibieron 50 µg del derivado de anticuerpo CD95XCD20 quimérico (NA-C20) por vía intravenosa (vena de la cola). Se tomaron muestras de sangre a las 0,5 h, 1 h, 2,0 h y 4,0 h después de la inyección. La concentración de anticuerpo en el suero se midió mediante la detección del anticuerpo unido a la línea celular B-linfoblastoide CD20⁺/CD95⁺ 6.4 B SKW 6.4 a través de citometría de flujo (FIG. 5).

Ejemplo 3: Prueba de concepto *in vitro* para la formación de anticuerpos biespecíficos con especificidad para CD20 y CD95.

- 50 *Potencia del derivado de anticuerpo CD95XCD20.*

La potencia para activar CD95 en células B CD20⁺/CD95⁺ fue demostrada tanto para la variante quimérica (NA-C20) como para la variante humanizada (Novotarg) en la línea celular B-linfoblastoide CD20⁺/CD95⁺ SKW 6.4. Las células se incubaron con una dilución en serie del derivado de anticuerpo CD95XCD20 y la proliferación celular se

determinó mediante un ensayo de incorporación de timidina. En síntesis, se sembraron 3×10^4 células por pocillo en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos y se añadió el derivado de anticuerpo en las concentraciones correspondientes. Después de 24 h, se añadió a las células [^3H]metil-timidina (adquirida de Hartman Analytics cat. nº MT6035/3), para alcanzar una concentración final de $0,5 \mu\text{Ci/pocillo}$. Después de otras 20 h de incubación, las células se recolectaron y la incorporación de tritio fue analizada mediante espectrometría de centelleo líquido (analizador de centelleo líquido PerkinElmer MicroBeta2). Pudo observarse una inhibición de la proliferación dependiente de la dosis, que demuestra la capacidad de NA-C20 y Novotarg para estimular selectivamente el receptor de muerte CD95 en células que expresan tanto CD20 como CD95 (FIG. 6).

Ejemplo 4: Prueba de concepto *in vivo* para la formación de anticuerpos biespecíficos con especificidad para CD20 y CD95.

Modelo de ratón de linfoma SCID in vivo.

Ratones SCID de cuatro a cinco semanas de edad (Bosma et al., Nature 1983 feb 10; 301 (5900): 527 - 30) fueron inyectados por vía intravenosa (vena de la cola) con una dosis letal de 1×10^7 células de línea celular SKW 6.4 CD20⁺/CD95⁺ B-linfoblastoide (n = 8). En los días 1, 2 y 3 después de la inyección, ocho ratones recibieron 20 μg del derivado de anticuerpo CD95XCD20 quimérico (NA-C20) mientras que los grupos testigo recibieron PBS o 20 μg de NA-CMel, respectivamente (i. p.). NA-CMel es un derivado de anticuerpo biespecífico con especificidad para CD95 y un segundo objetivo no relacionado (proteoglicano asociado a melanoma). Los resultados se muestran en la Figura 7. Después de 40 días, todos los ratones del grupo testigo habían muerto, mientras que habían sobrevivido siete ratones del grupo tratado con NA-C20. Seis ratones de este grupo seguían vivos después de 120 días. Esto indica agotamiento efectivo de las células SKW 6.4 CD20⁺/CD95⁺ en estos ratones. A su vez, siete de los ocho ratones del grupo testigo tratado con NA-CMel habían muerto el día 40. Evidentemente NA-CMel no es capaz de un agotamiento efectivo de las células tumorales. A diferencia de NA-C20, NA-CMel no tiene otra especificidad diana para proteínas expresadas en células SKW6.4 que CD95, a la que se une de forma monovalente. Esto previene el entrecruzamiento del receptor, que es un requisito previo para la activación efectiva de CD95 y la inducción de apoptosis. NA-CMel demuestra el modo de acción restringido a células diana de derivados de anticuerpos biespecíficos con especificidad para CD95. Por tanto es de esperar que NA-C20 sea eficaz solamente en células CD95⁺/CD20⁺, dejando sin afectar las células CD95⁺/CD20⁻, por ejemplo hepatocitos. Esto asegura una focalización selectiva y efectos reducidos fuera de la diana (Jung et al., Cancer Res. 2001, 1 de marzo; 61 (5): 1846-8).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Baliopharm AG

<120> ANTICUERPO BIESPECÍFICO RECOMBINANTE

<130> BA003P

<160> 29

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia VL

<400> 1

ES 2 649 991 T3

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 Glu Tyr Tyr
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

5 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 2
Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Met Gln
1 5 10 15

15 <210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 3
Val Ala Ser Asn Val Glu Ser
1 5

25 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 4
Gln Gln Ser Thr Lys Val Pro Trp Thr
1 5

35 <210> 5
<211> 115
<212> PRT
<213> artificial

40

ES 2 649 991 T3

<220>

<223> Secuencia VH

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

5 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Thr Asp Gly Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

10 <210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 6
Thr Asn Ala Met Asn
1 5

20 <210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> artificial

25 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 7
Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

30 Val Lys Asp
<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> Secuencia CDR

ES 2 649 991 T3

<400> 8
 Asp Gly Tyr Tyr
 1

5 <210> 9
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia VL

<400> 9
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
 20 25 30
 Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Thr
 85 90 95
 Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

15 <210> 10
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia VH

<400> 10

ES 2 649 991 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu 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 Asn Thr Asn
20 25 30

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Val Thr Asp Gly Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

5 <210> 11
<211> 106
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia VL

<400> 11
Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

15 <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

20

ES 2 649 991 T3

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 12
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 5 1 5

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 13
 Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 14
 Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 122
 <212> PRT
 30 <213> artificial

<220>
 35 <223> Secuencia VH

<400> 15
 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

ES 2 649 991 T3

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

5 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 16
 Ser Tyr Asn Met His
 1 5

15 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 17
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

25 <210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 18
 Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

35 <210> 19
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> artificial

40 <220>
 <223> Secuencia VL

<400> 19
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

45

ES 2 649 991 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 20
<211> 122
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia VH

<400> 20
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala 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 Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

15 <210> 21
<211> 218
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> Secuencia LC

ES 2 649 991 T3

<400> 21

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 Glu Tyr Tyr
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

5

<210> 22

<211> 657

<212> ADN

10 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia LC

15 <400> 22

ES 2 649 991 T3

gacattgtgc tcaccaatc tccagcttct ttggtgtgt ctctagggca gagagccacc 60
atctcctgca gagccagtga aagtgttgaa tattatggca caagtttaat gcaatggtac 120
caacagaagc caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ttgcatccaa cgtagaatct 180
ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccac 240
cctgtggagg aggatgatat tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtacgaa ggttccttgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacggactg tggtgcacc atctgtcttc 360
atcttccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctggtgt gtgcctgctg 420
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
acctcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtag 657

<210> 23
<211> 585
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia HC

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

ES 2 649 991 T3

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Thr Asp Gly Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

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

Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

ES 2 649 991 T3

<213> artificial

<220>
<223> Enlazador

5 <400> 24
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

10 <210> 25
<211> 1095
<212> ADN
<213> artificial

15 <220>
<223> Secuencia HC

<400> 25
gaggtgcagc ttgttgagac tgggtggagga ttggtgcagc ctaaagggtc attgaaactc 60
tcatgtgcag cctctggatt caccttcaat accaatgcc a tgaactgggt cggccaggct 120
ccaggaaagg gtttggaatg ggttgctcgc ataagaagta aaagtaataa ttatgcaaca 180
tactatgccg aatcagtgaa agacaggttc accatctcca gagatgattc acaaagcatg 240
ctctatctgc aaatgaacaa cttgaaagct gaggacacag ccatgtatta ctgtgtgact 300
gatggttact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcagggca gccctccgga 360
caggcttata tacagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcctc agtgaagatg 420
tcctgcaagg cttctggcta cacatttacc agttacaata tgcactgggt aaagcagaca 480
cctagacagg gcctggaatg gattggagct atttatccag gaaatggatg tacttcctac 540
aatcagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 600
atgcagctca gcagcctgac ctctgaagac tctgcggtct atttctgtgc aagagtggtg 660
tactatagta actcttactg gtacttcgac gtctggggca cagggaccac ggtcaccgtc 720
tcctcaggtg gaggcggttc aggcggaggt ggctctggcg gtggcggatc ggacatcggt 780
ctctcccagt ctccagctat cttgtctgca tctccagggg agaaggtcac catgacttgc 840
agagccagtt caagtgttag ttacatgcac tggtagcagc agaagccagg atcctcccc 900
aaaccctgga tttatgcccc atccaacctg gcttctggag tccctgctcg cttcagtggc 960
agtgggtctg ggacctctta ctctctcaca atcagcagag tggaggctga agatgctgcc 1020
acttattact gccagcagtg gagttttaac ccaccaagt tgggtgctgg gaccaagctg 1080

20 gagctgaaat gataa 1095

<210> 26
<211> 218
<212> PRT

25 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia LC

30 <400> 26

ES 2 649 991 T3

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

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

Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

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

Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5 <210> 27
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia LC

<400> 27

ES 2 649 991 T3

atggagaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt gggtgcccgg ctccaccggc 60
gacatcgtga tgaccacgac ccccgactcc ctggccgtgt ccctgggcca gagggccacc 120
atctcctgca gggcctccga gtccgtggag tactacggca cctccctgat gcagtggtag 180
cagcagaagc ccggccagcc cccaagctg ctgatctacg tggcctcaa cgtggagtcc 240
ggcgtgcccg acaggttctc cggctccggc tccggcaccg acttcaccct gaccatctcc 300
tccctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac ttctgccagc agtccaccaa ggtgccctgg 360
accttcggcc agggcaccaa gctggagatc aagcgtacgg tggccgcccc ctccgtgttc 420
atcttcccc cctccgacga gcagctgaag tccggcaccg cctccgtggt gtgcctgctg 480
aacaacttct accccagggg ggccaaggtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagtcc 540
ggcaactccc aggagtccgt gaccgagcag gactccaagg actccaccta ctccctgtcc 600
tccaccctga ccctgtccaa ggccgactac gagaagcaca aggtctacgc ctgcgagggtg 660
accaccagg gcctgtcctc ccccgtagcc aagtccttca acaggggcca gtgctga 717

<210> 28
<211> 585
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia HC

<400> 28
Glu Val Gln Leu Val Glu 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 Asn Thr Asn
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

ES 2 649 991 T3

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

ES 2 649 991 T3

Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Ser Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 340 345 350
 Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 355 360 365
 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 370 375 380
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr
 385 390 395 400
 Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr
 405 410 415
 Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 420 425 430
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr
 435 440 445
 Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 465 470 475 480
 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 485 490 495
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 500 505 510
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ala
 515 520 525
 Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 530 535 540
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 545 550 555 560
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe
 565 570 575
 Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 580 585

ES 2 649 991 T3

<210> 29
 <211> 1818
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia HC

<400> 29

atggagaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt gggtgcccgg ctccaccggc	60
gaggtgcagc tggaggagtc cggcggcggc ctggtgaagc ccggcggctc cctgaggctg	120
tcctgcgcgg cctccggcctt caccttcaac accaacgccca tgaactgggt gaggcaggcc	180
cccggcaagg gcctggagtg ggtggccagg atcaggtcca agtccaacaa ctaccgccacc	240
tactacgccg agtccgtgaa ggacaggttc accatctcca gggacgactc caagaacacc	300
ctgtacctgc agatgaactc cctgaagacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgtgacc	360
gacggctact actggggcca gggcaccacc ctgaccgtgt cctccgcctc caccaagggc	420
ccctccgtgt tccccctggc cccctcctcc aagtccacct ccggcggcac cggccccctg	480
ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa ctccggcggc	540
ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcagt cctccggcct gtactccctg	600
tcctccgtgg tgaccgtgcc ctctcctccc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	660
aaccacaagc cctccaacac caaggtggac aagaaggtgg agcccaagtc ctgcgacaag	720
accacacact cccccccctc ccccgcccc cccgtggccg gccctccgt gttcctgttc	780
cccccaagc ccaaggacac cctgatgatc tccaggaccc ccgaggtgac ctgcgtggtg	840
gtgggcgtgt cccacgagga ccccgaggtg aagtccaact ggtacgtgga cggcgtggag	900
gtgcacaacg ccaagaccaa gcccaggag gagcagtacc agtccacctc cagggtggtg	960
tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtg	1020
tccaacaagc agtgccctc ccccatcgag aagacgatat ccaaggccaa gggccagccc	1080
tccggccagg tgcagctggt gcagtccggc gccgaggtga agaagcccgg cgcctccgtg	1140
aaggtgtcct gcaaggcctc cggctacacc ttcacctcct acaacatgca ctgggtcagg	1200
10 caggcccccg gccagggcct ggagtggatc ggcgccatct accccggcaa cggcgacacc	1260
tcctacaacc agaagttcaa gggcagggtg accatcacca gggacacctc cgcctccacc	1320
gcctacatgg agctgtcctc cctgaggtcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg	1380
gtggtgtact actccaactc ctactggtac ttcgacgtgt ggggccaggg caccctggtg	1440
accgtgtcct ccggcggcgg cggctccggc ggcgcgggat ccggcggcgg cggctccgac	1500
atccagatga cccagtcctc ctctccctg tccgcctccg tgggcgacag ggtgaccatc	1560
acctgcaggg cctctcctc cgtgtcctac atgcactggg accagcagaa gcccgcaag	1620
gcccccaagc cctgatcta cggccccctc aacctggcct ccggcgtgcc ctccaggttc	1680
tccggctccg gctccggcac cgacttcacc ctgaccatct cctccctgca gcccgaggac	1740
ttcgccacct actactgcc a gcagtgtcc ttcaaccccc ccacctcgg ccagggcacc	1800
aagctggaga tcaagtga	1818

REIVINDICACIONES

1. Un formato de anticuerpo biespecífico, que comprende
 - a) un fragmento Fab que comprende un primer sitio de unión para un primer antígeno;
 - b) un fragmento scFv que comprende un segundo sitio de unión para un segundo antígeno; y
- 5 c) un dominio CH2 monomérico, en el que el fragmento Fab y el fragmento scFv están ligados a través del dominio CH2, en donde
 - el primer antígeno es CD95 y el segundo antígeno es CD20; o
 - el primer antígeno es CD20 y el segundo antígeno es CD95.
- 10 2. Formato de anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1, en el que el sitio de unión que se une a CD20 comprende seis regiones determinantes de complementariedad de dominios variables de anticuerpo (CDR1 a CDR6), en donde
 - A)
 - i) CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos RASSSVSYM (SEC ID 12);
 - ii) CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos APSNLAS (SEC ID 13);
 - 15 iii) CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQWSFNPPT (SEC ID 14);
 - iv) CDR4 comprende la secuencia de aminoácidos SYNMH (SEC ID 16);
 - v) CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEC ID 17); y
 - vi) CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos VVYYSNSYWYFDV (SEC ID 18);
 - o
 - 20 B) una variante funcionalmente activa del mismo, en la que al menos uno de
 - i) CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos RASSSVSYM (SEC ID 12);
 - ii) CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos APSNLAS (SEC ID 13);
 - 25 iii) CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos QQWSFNPPT (SEC ID 14);
 - iv) CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SYNMH (SEC ID 16);
 - v) CDR5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEC ID 17); y / o
 - 30 vi) CDR6 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos VVYYSNSYWYFDV (SEC ID 18).
- 35 3. Formato de anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1 o 2, que comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID 11 y/o un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID 15 o variantes funcionalmente activos del mismo.
4. Formato de anticuerpo biespecífico según la reivindicación 3, en el que la variante es una variante humanizada que comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID 19 y/o un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID 20, o una variante funcionalmente activa del mismo.
- 40 5. Formato de anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sitio de unión que se une a CD95 comprende seis regiones determinantes de complementariedad de dominios de anticuerpo variables (CDR1 a CDR6), en donde
 - A)
 - i) CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos RASESVEYYGTSLMQ (SEC ID 2);

- ii) CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos VASNVES (SEC ID 3);
 - iii) CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQSTKVPWT (SEC ID 4);
 - iv) CDR4 comprende la secuencia de aminoácidos TNAMN (SEC ID 6);
 - v) CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos RIRSKSNNYATYYAESVKD (SEC ID 7); y
 - 5 vi) CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos DGY Y (SEC ID 8);
- o
- B) una variante funcionalmente activa del mismo, en la que al menos uno de
- i) CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos RASESVEYYGTSLMQ (SEC ID 2);
 - 10 ii) CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos VASNVES (SEC ID 3);
 - iii) CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos QQSTKVPWT (SEC ID 4);
 - iv) CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos TNAMN (SEC ID 6);
 - 15 v) CDR5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos RIRSKSNNYATYYAESVKD (SEC ID 7); y
 - vi) CDR6 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos DGY Y (SEC ID 8).
- 20 6. Formato de anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID 1 y/o un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID 5, o variantes funcionalmente activas del mismo.
7. Formato de anticuerpo biespecífico según la reivindicación 6, donde la variante es una variante humanizada que comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 9 y/o un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 10, o una variante funcionalmente activa del mismo.
- 25 8. Formato de anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende una secuencia de cadena ligera de SEC ID 21 y una secuencia de cadena pesada de SEC ID 23, o variantes funcionalmente activas del mismo.
9. Formato de anticuerpo biespecífico según la reivindicación 8, en donde la variante es una variante humanizada que comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 26 y/o un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 28, o una variante funcionalmente activa del mismo.
- 30 10. Formato de anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que se une a CD20 con una $K_d < 10^{-8}$ M y/o que se une a CD95 con una $K_d < 10^{-8}$ M.
- 35 11. Formato de anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso médico.
12. Composición farmacéutica que comprende el formato de anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 10^a y un vehículo o excipiente aceptable farmacéuticamente.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno de las células B.
- 40 14. Secuencia de ácidos nucleicos que codifica el formato de anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
15. Método para producir el formato de anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende cultivar o mantener una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 14^a bajo condiciones tales que dicha célula hospedadora produce el formato de anticuerpo biespecífico.
- 45

Fig. 1

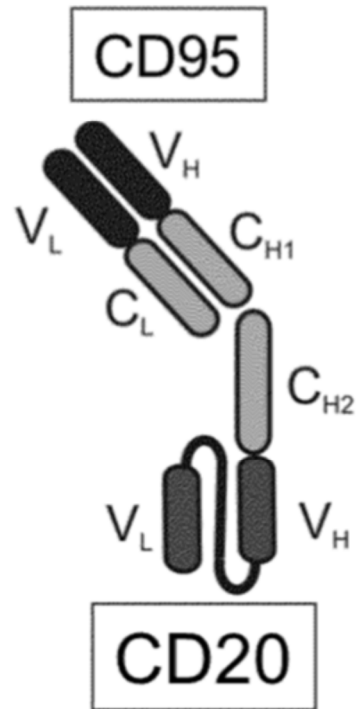


Fig. 2:

Fig. 2A: Secuencias murinas de un anticuerpo anti-CD95 (Apo-1)

```
>APO-VL
kappa de ratón subgrupo III

SEQ ID 1:
DIVLVTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYGTSMLMQWYQOKPGQPPKLLIYVASNVES
GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQQSTKVPWTFGGGKLEIKR

CDR-L1: RASESVEYYGTSMLQ (SEQ ID 2)
CDR-L2: VASNVES (SEQ ID 3)
CDR-L3: QQSTKVPWT (SEQ ID 4)

>APO-VH
pesada de ratón subgrupo IIIId

SEQ ID 5:
EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYAT
YYAESVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNLLKAEDTAMYVCVTDGYWYGQGTTLTVSS

CDR-H1: TNAMN (SEQ ID 6)
CDR-H2: RIRSKSNNYATYYAESVKD (SEQ ID 7)
CDR-H3: DGYW (SEQ ID 8)
```

Fig. 2B: secuencias humanizadas de un anticuerpo anti-CD95 (Apo-1)

```
>humApo-VL
kappa humano subgrupo IV

SEQ ID 9:
DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVEYYGTSMLMQWYQOKPGQPPKLLIYVASNVES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSTKVPWTFGQGTKLEIK

>humApo-VH
humano subgrupo III

SEQ ID 10:
EVQLVESGGGLVQPKGSLRLSCAASGFTFNTNAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYAT
YYAESVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKTEDTAVYVCVTDGYWYGQGTTLTVSS
```

Fig. 2C: secuencias murinas anticuerpo anti-CD20

>CD20-VL (registro n° M17953)
kappa de ratón subgrupo VI

SEQ ID 11:
DIVLSQSPAILSASPGKEVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYAPSNLASGVPARFS
GSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGAGTKLELK

CDR-L1: RASSSVSYM (SEQ ID 12)
CDR-L2: APSNLAS (SEQ ID 13)
CDR-L3: QQWSFNPPT (SEQ ID 14)

>CD20-VH (registro n° M17954)
pesada de ratón subgrupo IIb

SEQ ID 15:
QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPRQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK
FKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVVVYYSNSYWFVDVWGTTTVTVSS

CDR-H1: SYNMH (SEQ ID 16)
CDR-H2: AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID 17)
CDR-H3: VVYYSNSYWFVDV (SEQ ID 18)

Fig. 2D: secuencias humanizadas anticuerpo anti-CD20

>humCD20-VL
kappa humana subgrupo I

SEQ ID 19:
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKLEIK

>humCD20-VH
humano subgrupo I

SEQ ID 20:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK
FKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVVVYYSNSYWFVDVWGQGLTVTVSS

Fig. 2E: Anticuerpo biespecífico CD95xCD20 (formato bsFabXsc, representado en Fig.1)

i) versiones quiméricas

cadena ligera (versión quimérica):

CD95-VJ + CL humano (kappa); cadena ligera quimérica sin péptido líder

SEQ ID 21:

```

1      DIVLTQSPAS    LAVSLGQRAT    ISCRASESVE    YYGTSLMQWY    QQKPGQPPKL
51     LIYVASNVES    GVPARFSGSG    SGTDFSLNIH    PVEEDDIAMY    FCQQSTKVPW
101    TFGGGTKLEI     KRTVAAPSVF    IFPPSDEQLK    SGTASVVCLL    NNFYPREAKV
151    QWKVDNALQS      GNSQESVTEQ    DSKDSTYSLS    STLTLSKADY    EKHKVYACEV
201    THOGLSSPVT    KSFNRGEC*
    
```

Aminoácidos del 1 al 111: VJ anti-CD95 (ratón)
 subrayados: cadena kappa constante humana

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID 22):

```

GACATTGTGCTCACCCAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGAGCCACC
ATCTCTGCAGAGCCAGTGAAGTGTGAATATTATGGCACAAGTTTAAATGCAATGGTAC
CAACAGAAGCCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGTTGCATCCAACGTAGAATCT
GGGGTCCCTGCCAGTTTGTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCAC
CCTGTGGAGGAGGATGATATTGCAATGTATTTCTGTGTCAGCAAAGTACGAAGGTTTCCTTGG
ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTG
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG
GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTCGCAAGTC
ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
    
```

cadena pesada (versión quimérica):

CD95-VDJ + CH1 humano + bisagra + CH2 modificado + CD20scFv (VH-VL)

cadena pesada quimérica sin péptido líder

SEQ ID 23:

```

1      EVQLVETGGG    LVQPKGSLKL    SCAASGFTFN    TNAMNWRQA    PGKGLEWVAR
51     IRSKSNNYAT    YYAESVKDRF    TISRDDSQSM    LYLQMNNLKA    EDTAMYICVT
101    DGYYWQGQTT     LTVSSASTKG    PSVFPLAPSS    KSTSGGTAAL    GCLVKDYFPE
151    PVTVSWNSGA     LTSGVHTFPA    VLQSSGLYSL    SSVVTVPSSS    LGTQTYICNV
201    NHKPSNTKVD     KKVEPKSCDK    THTSPSPAP     PVAGPSVFLF    PPKPKDTLMI
251    SRTPEVTCVV     VGVSHEDEPEV    KFNWYVDGVE    VHNAKTKPRE    EQYQSTYRVV
301    SVLTVLHQDW     LNGKEYKCKV    SNKQLPSPIE    KTISKAKGQP    SGQAYLQQSG
351    AELVRPGASV     KMSCKASGYT    FTSYNMHWVK    QTPRQGLEWI    GAIYPGNGDT
401    SYNQKFKGKA     TLTVDKSSST    AYMQLSSLTS    EDSAVYFCAR    VVYYSNSYWY
451    FDVWGTGTTVT    VSSGGGGSG     GGSGGGGSD    IVLSQSPAIL    SASPGKVTM
501    TCRASSVSYS     MHWYQQKPGS    SPKPWIYAPS    NLASGVPARF    SGSGSGTSYS
551    LTISRVEAED     AATYYCQQWS    FNPPTFGAGT    KLELK**
    
```

- Aminoácidos 1 a 115: VDJ anti-CD95 (ratón)
- aminoácidos subrayados: CH1 humano, bisagra modificada y CH2 modificado seguido por **GQP** (= tres primeros aminoácidos de CH3) seguido por los aminoácidos SG
- aminoácidos en *itálica* de 343 a 464 anti-CD20 (VH) GenBank n° M17953
- GGGSGGGSGGGSGGS (SEQ ID 24) elemento enlazador entre Vh y Vl
- aminoácidos en **negrita** del 480 al final (585) anti-CD20 (VL) GenBank n° M17954

Fig. 2E (continuación)

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID 25):

GAGGTGCAGCTTGTTGAGACTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAAACTC
TCATGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAATACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACA
TACTATGCCGAATCAGTGAAAGACAGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATG
CTCTATCTGCAAATGAACAACCTGAAAGCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGTGACT
GATGGTTACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGGGCAGCCCTCCGGA
CAGGCTTATCTACAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATG
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAGCAGACA
CCTAGACAGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCAGGAAATGGTGATACTTCCTAC
AATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAC
ATGCAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAAGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGTGGTG
TACTATAGTAACTCTTACTGGTACTTCGACGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTC
TCCTCAGGTGGAGGCGGTTACAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCGTT
CTCTCCCAGTCTCCAGCTATCTTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACTTGC
AGAGCCAGTTCAAGTGTTAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCC
AAACCCTGGATTTATGCCCCATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC
AGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCC
ACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTTTTAACCCACCCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTG
GAGCTGAAATGATAA

Fig. 2E (continuación)

ii) versiones humanizadas

cadena ligera (versión humanizada):

CD95-VJ humanizada / CL humana

SEQ ID 26:

```

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVEEYGTSLMQWYQQKPGQPPLLIYVASNVES
 1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      GVPDRFSGSGSGTDFLTITISLQAEDVAVYFCQQSTKVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF
 61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS
121  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
      STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
181  -----+-----+-----+-----+-----+ 219
    
```

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID 27):

Nt-secuencia de:

CD95-VJ humanizada + LC kappa humana

subrayado: secuencia señal LC kappa de Ig murina

negrita: codón de parada

```

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGCTCCACCGGCGACATCGTGATGACCC
AGTCCCCCGACTCCCTGGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGGGCCCTCCGAGTCCGTGGAGTA
CTACGGCACCTCCCTGATGCAGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGTGGCCTCC
AACGTGGAGTCCGGCGTGCCCGACAGGTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCC
TGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGTCCACCAAGGTGCCCTGGACCTTCGCCAGGGCACCAA
GCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGC
ACCGCTCCGTGGTGTGCTGCTGAACAATTCTACCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCC
TGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCCACCTACTCCCTGTCTCCACCCT
GACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTCTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCTCCCC
GTGACCAAGTCTTCAACAGGGGCGAGTGTGA
    
```

Fig. 2E (continuación)

cadena pesada (versión humanizada) :

CD95-VDJ-CH1-H-CH2 humanizado (atenuado)/CD20scFv (VH-VL) humanizado

SEQ ID 28:

```

      EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFNTNAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYAT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      YYAESVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVTDGYWQGTTTLTVSSASTKG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
      SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPPPSPAPPVAGPSVFLF
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
      PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVGVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVV
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
      SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGQVQLVQSGAEVKKPGASV
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
      KVSKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTITRDTSAST
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
      AYMELSSLRSEDVAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSD
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
IQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPKGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRF
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
      SSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKLEIK**
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 587

```

Fig. 2E (continuación)

Secuencia de nucleótidos (SEC ID 29):

Secuencia Nt de:

CD95-VDJ-CH1-H-CH2 humanizado (atenuado)—CD20scFv (VH-VL) humanizado
subrayado: secuencia señal LC kappa de Ig murina

negrita: codón de parada

ATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGCTCCACCGGCGAGGTGCAGCTGGTGG
AGTCCGGCGGCGGCCTGGTGAAGCCCGGCGGCTCCCTGAGGCTGTCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCAACAC
CAACGCCATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCAGGATCAGGTCCAAGTCCAAC
AACTACGCCACCTACTACGCCGAGTCCGTGAAGGACAGGTTACCATCTCCAGGGACGACTCCAAGAACACCCCTGT
ACCTGCAGATGAACTCCCTGAAGACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGTGACCGACGGCTACTACTGGGGCCA
GGGACACCCTGACCGTGTCTCCGCCCTCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCTCTCCAAGTCC
ACCTCCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGGTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACT
CCGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGT
GGTGACCGTGCCCTCTCTCCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAG
GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTCCCCCCCCCTCCCCGCCCCCCCCCGTGGCCG
GCCCTCCGTGTTCTGTTCCTGTTCCTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGT
GGTGGTGGGCGTGTCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC
AAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACCAGTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACT
GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGCAGCTGCCCTCCCCATCGAGAAGACGATATCCAA
GGCCAAGGGCCAGCCCTCCGGCCAGGTGCAGTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCTCCGTG
AAGGTGTCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTCACCTCTACAACATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCGGCCAGG
GCCTGGAGTGGATCGGCGCCATCTACCCCGGCAACGGCGACACCTCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTGC
CATCACCAGGGACACCTCCGCCCTCACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTAC
TACTGCGCCAGGGTGGTGTACTACTCCAACCTCTACTGGTACTTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCG
TGTCTCCGGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGATCCGGCGGCGGCGGCTCCGACATCCAGATGACCCAGTCCCC
CTCCTCCCTGTCCGCCCTCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGGGCCTCCTCCTCCGTGTCTTACATGCAC
TGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCCCTGATCTACGCCCTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCTT
CCAGTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCAC
CTACTACTGCCAGCAGTGGTCTTCAACCCCCCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG**TGA**

Fig. 3

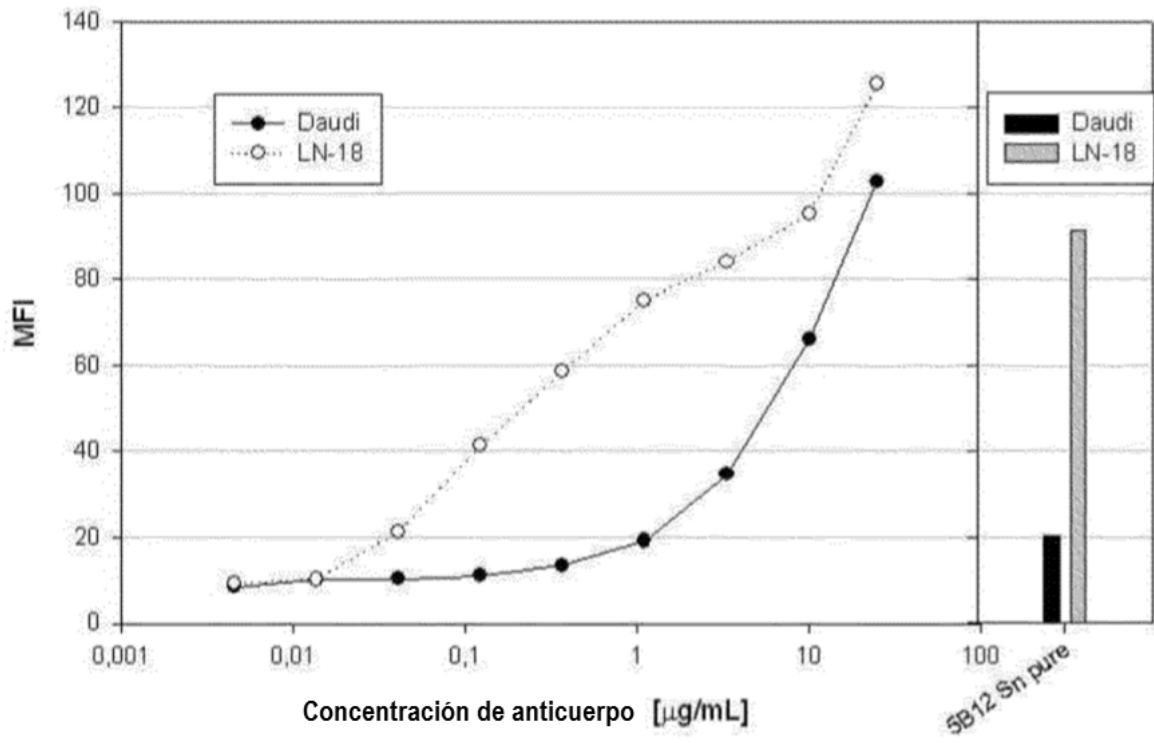


Fig. 4

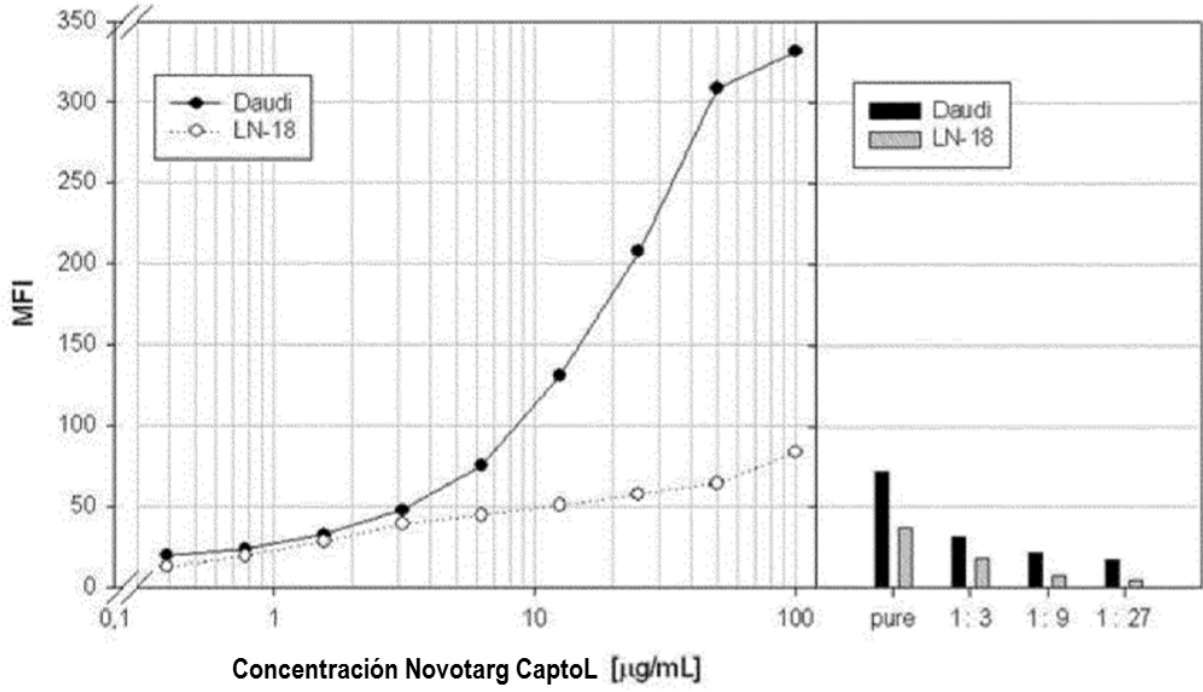


Fig. 5

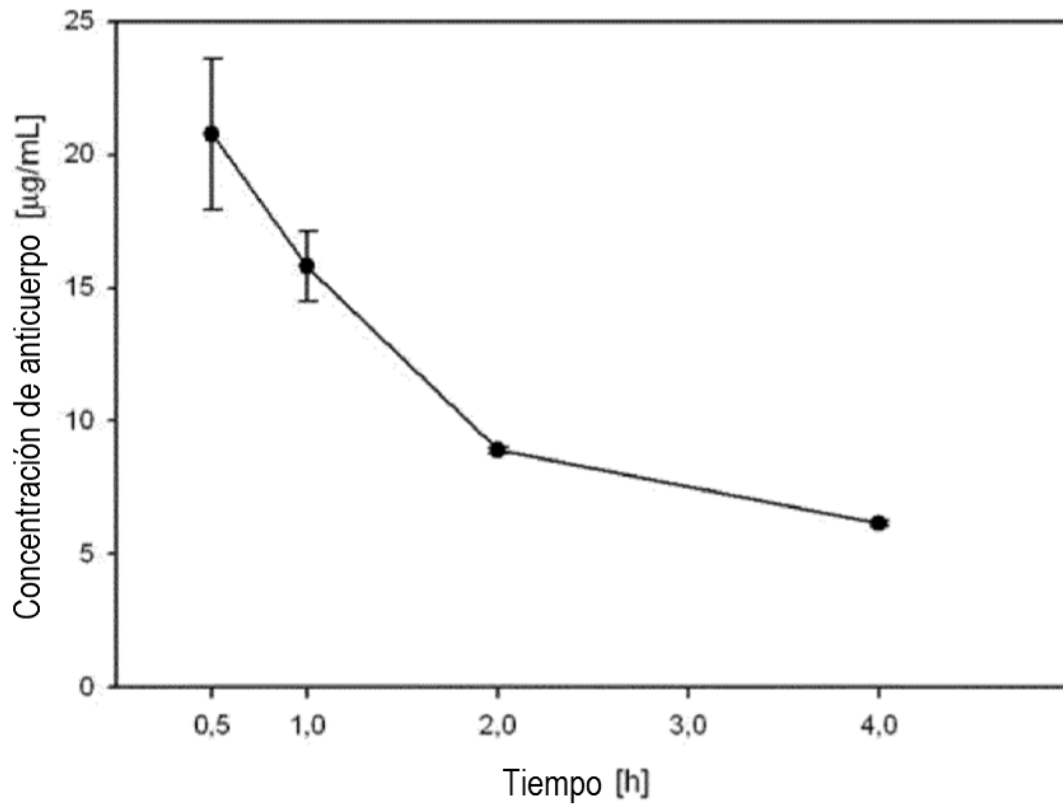


Fig. 6

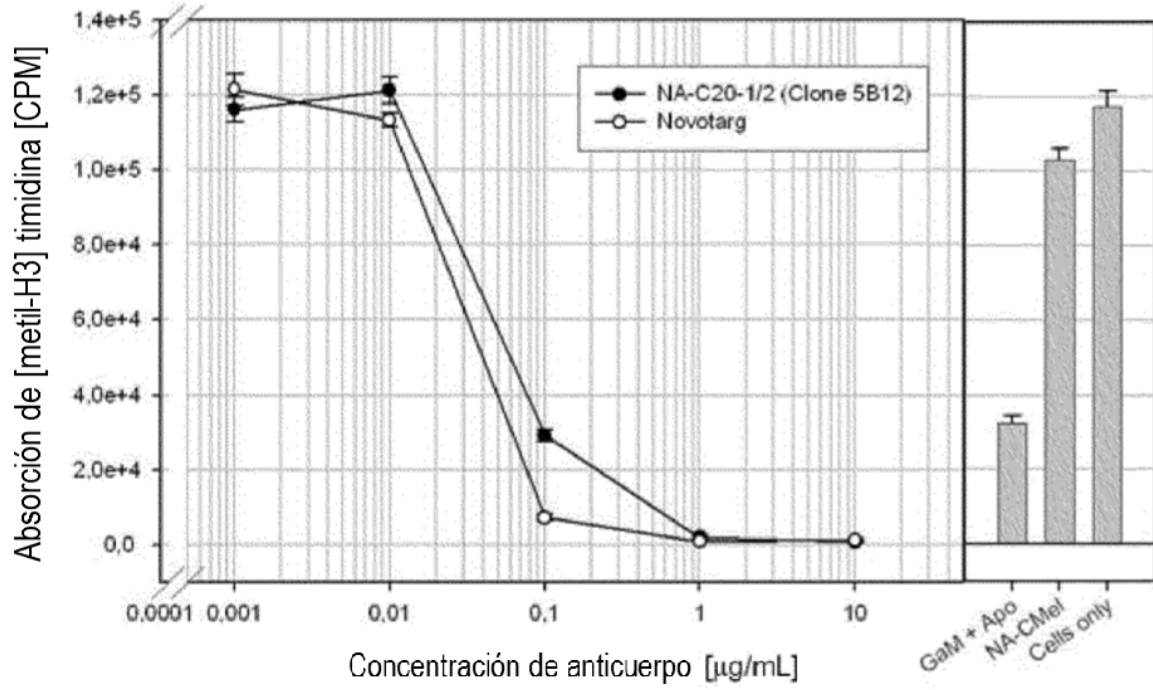


Fig. 7

